

Nancy 1969

ARCHIVES
D'ANATOMIE MICROSCOPIQUE
ET DE
MORPHOLOGIE EXPÉRIMENTALE

==
EXTRAIT

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU POUVOIR TÉRATOGENE DU BLEU TRY PAN
CHEZ L'EMBRYON DE POULET

Par R. LANOT

(Laboratoire de Zoologie, 30, rue Sainte-Catherine, 54-Nancy.)

—
Tome 60 — N° 1 — 1971

==
MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS (VI^e)



CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU POUVOIR TÉRATOGENÈ DU BLEU TRYPAN CHEZ L'EMBRYON DE POULET (*)

Par R. LANOT

(Laboratoire de Zoologie, 30, rue Sainte-Catherine, 54-Nancy.)

INTRODUCTION

Le bleu trypan a été utilisé dans les travaux d'embryologie dès le début de ce siècle (ZARETZKY, 1910; GRÄPER, 1911). Pourtant, ce n'est qu'en 1941 que ANCEL et LALLEMAND constatèrent son pouvoir tératogène chez l'embryon de Poulet traité au cours de la troisième journée d'incubation.

Cette action tératogène du colorant se manifeste également chez les rongeurs (GILLMAN et coll., 1948), les Amphibiens (WADDINGTON et PERRY, 1956; GREENHOUSE et HAMBURGH, 1968), elle a été aussi décrite chez un Poisson (INGALLS, 1957; BATTLE et LAALE, 1960). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette action (revue dans BECK et LLOYD, 1966).

Les anomalies provoquées dans les différents groupes ne sont pas identiques. Cependant, dans presque tous les cas on observe à la fois des atteintes du mésoderme du bourgeon caudal et de l'axe embryonnaire et des œdèmes dont la localisation et l'importance sont variables dans les divers groupes.

Chez l'embryon de Poulet, le bleu trypan provoque surtout des anomalies du bourgeon caudal, en particulier de l'anourie, lorsque l'on observe les embryons plusieurs jours après le dépôt de colorant. D'autres anomalies moins fréquentes peuvent aussi se manifester (BEAUDOIN et WILSON, 1958; STÉPHAN et SUTTER, 1960).

Observés plus tôt, les embryons montrent des œdèmes qui siègent surtout dans la région caudale (MULHERKAR, 1960; STÉPHAN et SUTTER, 1960-1961). STÉPHAN et SUTTER ont aussi constaté que les lames segmentaires, les derniers somites formés et les organes axiaux en

(*) Cet article recouvre en partie le travail présenté à une thèse soutenue à la Faculté des Sciences de Nancy, en vue d'obtenir le grade de Docteur d'Etat ès Sciences Naturelles (thèse enregistrée au C.N.R.S. sous le numéro AO 3911).

général, manquaient de matériel cellulaire. En apparence, le traitement se traduirait d'abord par un défaut de croissance. En outre, certains embryons présentent des anomalies somitiques. Dans certains cas, le découpage des lames segmentaires se fait de façon irrégulière et aboutit à la formation de somites anormalement longs (blocs de somites).

Sur le plan physiologique, KAPLAN et GRABOWSKI (1967) ont montré que le traitement se traduit à longue échéance par une modification de la tonicité du sérum des embryons prélevés au cinquième jour, la pression osmotique est augmentée ainsi que le taux de potassium, alors que le taux de sodium est diminué. D'autre part, l'activité respiratoire du blastoderme est stimulée après 12 heures de traitement (KAPLAN et JOHNSON, 1968).

Dans le présent travail, les questions suivantes ont été abordées :

1° Des embryons de stades différents réagissent-ils de façon comparable ?

2° A quel moment apparaissent les premières atteintes du colorant, comment se manifestent-elles ?

3° Le colorant pénètre-t-il dans l'embryon ?

4° Les déficiences observées sont-elles dues à un défaut de la croissance cellulaire ?

5° Les anomalies résultent-elles d'une atteinte directe de l'embryon ou d'une modification du milieu extérieur ?

6° Comment agit le bleu trypan lorsque se forment des blocs de somites ?

7° Peut-on mettre en évidence des altérations physiologiques précoces chez les embryons ?

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expériences relatées dans ce travail ont été effectuées à divers stades du développement sur des embryons de Poulet de souches diverses, principalement sur des œufs de race Leghorn blanche et sur des œufs hybrides de Sussex herminées et de Rhode Island.

Les embryons ont été traités dans l'œuf ou en culture *in vitro*.

TRAITEMENT DANS L'ŒUF :

Les œufs sont préparés selon la technique d'Et. WOLFF (1936). L'injection de colorant est faite à l'aide d'une aiguille de verre reliée à une microseringue par un cathéter de polyéthylène, l'aiguille étant maintenue en place par un système à cardan. Elle est pratiquée dans la cavité sous-germinale, au voisinage immédiat de l'embryon, en actionnant le vernier de la microseringue. L'opération doit être conduite lentement.

Dans ces conditions, le colorant se répartit de façon très homogène dans la cavité sous-germinale ; il arrive cependant que, chez les jeunes blastodermes, des fragments de jaune

non digérés adhèrent encore au blastoderme et empêchent localement la diffusion du colorant.

TRAITEMENT « IN VITRO » :

Les embryons sont explantés, selon la méthode de GALLERA et NICOLET (1961), sur de l'albumine diluée dans un liquide de Tyrode modifié.

Le traitement par le colorant peut être fait de deux manières, soit selon la méthode de NICOLET (1965), en dissolvant le colorant dans le milieu de culture, soit, comme l'a fait MULHERKAR (1960), en déposant une goutte de solution colorée sur l'embryon. Etant donné que le colorant diffuse peu à travers l'embryon, les deux méthodes donnent des résultats comparables pour des concentrations identiques.

SOLUTIONS UTILISÉES :

Le bleu trypan qui a servi dans la plupart des expériences est la préparation commerciale de Grüber (Hollborn und Sohne, Leipzig). Pour un certain nombre d'essais, il a

été purifié de son composant éthanosoluble rouge.

Dans l'un et l'autre cas, il a été utilisé, suivant les données de STÉPHAN et SUTTER (1960), à la concentration de 1‰ en solution dans le liquide de Tyrode. Des quantités de 2 à 5 centièmes de millilitre ont été administrées selon le stade du traitement. Les témoins ont reçu une quantité égale de liquide de Tyrode.

TECHNIQUES HISTOLOGIQUES :

Les embryons ont été fixés au moyen de divers fixateurs, principalement les liquides de Bouin, de Serra, de Clarke et le formol neutre à 10 %. Ils ont été inclus dans la paraffine et débités en coupes (de 5 microns d'épaisseur) selon les techniques habituelles, puis colorés par l'hématoxyline ferrique ou l'hémalum et l'éosine.

TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES :

Les acides nucléiques ont été étudiés dans les cellules en dégénérescence, après coloration par le vert de méthyle-pyronine ou le bleu de toluidine et par la méthode de Feulgen. Certaines de ces colorations ont été faites parfois successivement sur les mêmes préparations. La spécificité de la coloration des ARN a été contrôlée par le test à la RNA-ase.

Détection de la succinodéshydrogénase :

Le milieu d'incubation, qui dérive de celui utilisé par SPRATT (1958), a la composition suivante :

- liquide de Tyrode à la concentration de 123 mM : 200 ml ;
- nitro-BT de Gurr : 50 mg ;
- succinate de sodium : 100 mg.

Après l'incubation, les embryons sont fixés au formol neutre froid et montés entre lame et lamelle dans la gélatine glycinée sans ringage préalable. Certains ont été étudiés histologiquement selon les méthodes d'inclusion et de montage habituelles, les passages par les alcools et le toluène devant être brefs. Les coupes, dans ce cas, ont été contre-colorées par une solution aqueuse de fuchsine basique à 1 %. Les variations de l'activité succinodéshydrogénasique au cours du développement normal seront décrites dans une autre publication.

Activités phosphatasiques :

La phosphatase acide a été recherchée par la méthode de Gomori. Les embryons sont incubés entiers dans le substrat (MARIT et MILAIRE, 1961) après fixation par le formol froid. La révélation du phosphate de calcium est faite à l'aide du sulfure d'ammonium. La réaction est appliquée à l'embryon entier.

Les embryons ont été observés *in toto* après coloration, puis inclus dans la paraffine et coupés pour l'examen histologique.

Quelques embryons ont été colorés par la méthode de Burstone après une fixation formolée de courte durée (10 minutes).

Pour l'étude de l'activité phosphatasique en milieu alcalin, les embryons ont été fixés au formol neutre pendant 5 à 10 minutes. Ensuite, ils ont été colorés par la méthode de Gomori, soit immédiatement après la fixation, soit après incubation dans un milieu de composition définie.

Les embryons ont été incubés en présence de glucose (dans le liquide de Tyrode ajusté à 123 mM) ou d'ATP (sel disodique) aux concentrations 0,0001M, 0,001M et 0,002M ou de β -glycérophosphate de sodium aux concentrations de 0,0001M et 0,001M en solution dans le Tyrode. Des contrôles ont été effectués à l'aide des inhibiteurs suivants : KCN à la concentration de 0,01M, L cystéine à la concentration de 2mg/ml ($\neq$ 0,06M) pour éliminer les effets éventuels de la phosphatase alcaline, parachloromercureibenzoate (PCMB) de sodium à la concentration de 0,0025M pour inhiber les ATP-ases.

Les milieux d'incubation étaient tamponnés par le véronal à 0,4 % ou parfois par du blanc d'œuf.

Enfin, pour éliminer les phosphates préformés, une série d'embryons préalablement fixés a été traitée par le nitrate d'argent à 0,5 % pendant 15 minutes, puis rincée au véronal sodique à 0,4 % et dans une solution de NaCl à 0,8 %.

Technique de comptage :

Les comptages ont été effectués à l'aide d'un oculaire à diaphragme carré réglable. Les cellules ont été comptées à différents niveaux sur 10 coupes successives, le diaphragme étant ajusté de manière à délimiter une surface de 2 500 μ^2 , surface qui est du même ordre de grandeur que celle des ébauches à examiner. Pour éviter de compter

deux fois le même noyau, seuls ont été retenus les noyaux qui présentaient un nucléole bien distinct.

TECHNIQUES CYTOPHOTOMÉTRIQUES :

Les quantités d'ADN ont été évaluées par cytophotométrie en lumière visible. Cette étude a été faite sur deux des embryons traités précocement, qui ont servi aux dénombrements. Les embryons ont été fixés au liquide de Serra pendant 40 minutes. L'hydrolyse pour la réaction de Feulgen a duré 12 minutes; elle a été conduite à 60°.

Les noyaux choisis pour les mesures ont été dessinés, agrandis à la chambre claire, puis leur surface mesurée par planimétrie.

Les mesures étant effectuées sur des coupes histologiques, la technique cytophotométrique

offre peu de précision. Dans ce cas, les mesures sont faites le plus souvent sur des fragments de noyaux et non sur des noyaux entiers (IVERSEN, 1960). Dans notre cas, toutes les mesures portent sur des noyaux incomplets, du fait que l'épaisseur des coupes correspond au diamètre moyen des noyaux. Cependant, avec les techniques de fixation et de coloration utilisées, la chromatine se répartit en deux couches, l'une se dispose contre la membrane nucléaire, l'autre recouvre les nucléoles. Dans ces conditions, si l'on ne retient pour les mesures que les noyaux qui contiennent un nucléole, il est possible d'évaluer la ploïdie des noyaux. La mesure faite sur un noyau tétraploïde, même fragmentaire, est toujours supérieure à celle faite sur un noyau diploïde entier. Le calcul, portant sur des mesures caryométriques, montre en effet que le volume des fragments de noyaux retenus correspond au moins à 58,3 % du volume des noyaux entiers.

Les mesures photométriques ont été effectuées sur le microphotomètre MPE de Leitz. La transmission de chaque noyau a fait l'objet de trois mesures. Entre chacune de ces mesures la transmission d'une plage de grandeur équivalente au voisinage immédiat du noyau a été évaluée. Les quantités d'ADN calculées à partir de ces données sont exprimées en unités arbitraires. Les valeurs obtenues sont réparties en histogrammes où la fréquence des valeurs est exprimée en pourcentage.

L'erreur sur les mesures photométriques est de 1 %. L'erreur sur les mesures planimétriques est faible (2 à 3 %) dans le cas des cellules mésodermiques. Elle est plus importante pour les noyaux des cellules neurales où le coefficient de variation peut atteindre 10 %.

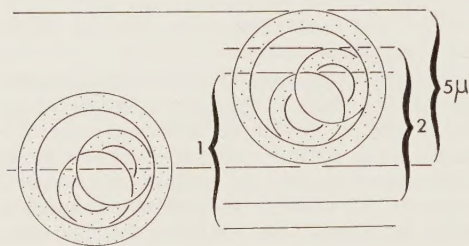


FIG. 1. — Schéma de la répartition de la chromatine dans les noyaux.

La chromatine est représentée en pointillés. Elle se dépose contre la membrane nucléaire et autour du nucléole. L'épaisseur de la coupe (accolade) égale le diamètre du noyau, de sorte qu'il y a peu de chances de rencontrer un noyau entier. Les fragments de noyaux retenus pour les mesures correspondent aux cas 1 et 2; ils contiennent plus de la moitié de la chromatine du noyau.

RÉSULTATS

I. — LES RÉACTIONS PRÉCOCES DES EMBRYONS TRAITÉS PAR LE BLEU TRYPAN

Les auteurs qui se sont intéressés aux effets tératogènes du bleu trypan chez l'embryon de Poulet n'ont pas étudié les premières étapes de ces phénomènes. Il

est cependant évident qu'une telle étude a plus de chance de rendre compréhensibles les effets qui se manifestent après plusieurs heures d'incubation. De même, il était intéressant de connaître les réactions d'embryons plus jeunes, en particulier des embryons dépourvus de circulation sanguine.

Aussi, avons-nous traité les embryons à divers stades de l'embryogenèse. Ils ont été observés après des temps variables. Le traitement est effectué, soit dans l'œuf, soit *in vitro*, de façon à observer plusieurs fois les mêmes embryons en cours d'évolution. De plus, certains embryons cultivés *in vitro* n'ont été traités que pendant quelques heures (1 h 30 à 5 h) puis reportés en milieu normal.

La plupart des embryons étudiés ont été traités entre 18 et 40 heures d'incubation. Pour cette étude, ont été retenus 69 embryons traités dans l'œuf, qui ont été comparés à 68 témoins traités dans les mêmes conditions par du liquide de Tyrode. D'autre part, 90 embryons traités *in vitro* ont été comparés à 60 témoins explantés.

A. — COMPORTEMENT DES TÉMOINS

1° EMBRYONS TRAITÉS DANS L'ŒUF

L'injection de liquide de Tyrode à des embryons de moins de 36 heures d'incubation provoque surtout une forte mortalité au cours des 2 jours qui suivent le traitement. Si les embryons sont choisis de manière à éliminer les plus débiles (la même précaution étant prise lorsqu'il s'agit de traiter d'autres embryons par le bleu trypan), l'injection ne produit, au pire, que de légers défauts de croissance. En outre, ces déficiences n'apparaissent bien qu'après 12 heures de traitement environ, de sorte que les anomalies beaucoup plus évidentes, qui apparaissent plus tôt chez les embryons traités par le bleu trypan, sont dues au colorant.

2° EMBRYONS

TRAITÉS EN CULTURE « IN VITRO »

Tous les embryons témoins explantés se sont développés normalement.

B. — COMPORTEMENT DES EMBRYONS TRAITÉS

1° ASPECTS MORPHOLOGIQUES

Les embryons traités après explantation montrent les mêmes altérations que ceux qui l'ont été dans l'œuf. De plus, ces altérations apparaissent dans le même ordre dans les deux cas. Cependant, les embryons traités dans l'œuf réagissent plus lentement, surtout lorsque le traitement est appliqué après la trentième heure d'incubation. Selon les stades, les types d'anomalies provoquées sont plus ou moins divers.

Aux stades présomitiques, le traitement détermine rapidement dans tous les cas, un état œdémateux et une inhibition des mouvements morphogénétiques. A plus longue échéance, la morphogenèse est naturellement très altérée (fig. 2, C et D).

Aux stades des premiers somites, l'œdème apparaît également dans tous les cas au bout de 3 heures de traitement, et de façon constante au niveau de la ligne primitive.

Cet œdème donne naissance à deux ou trois vésicules (la troisième en arrière de la ligne primitive). Elles confluent au cours du traitement et distendent les feuillets limitants, ectoderme et endoderme, alors que le mésenchyme est repoussé vers la périphérie et vers la région axiale de la ligne primitive. Très souvent, le blastoderme présente aussi une dilatation de la région amnio-cardiaque. Dans cette région, l'œdème ne persiste pas longtemps, il disparaît après 5 à 6 heures de traitement. L'inhibition des mouvements morphogénétiques se marque plus dans la région postérieure de l'embryon que dans la région pro-encéphalique. Cependant, après quelques heures, la morphogenèse des territoires — de ceux qui se trouvaient en place au

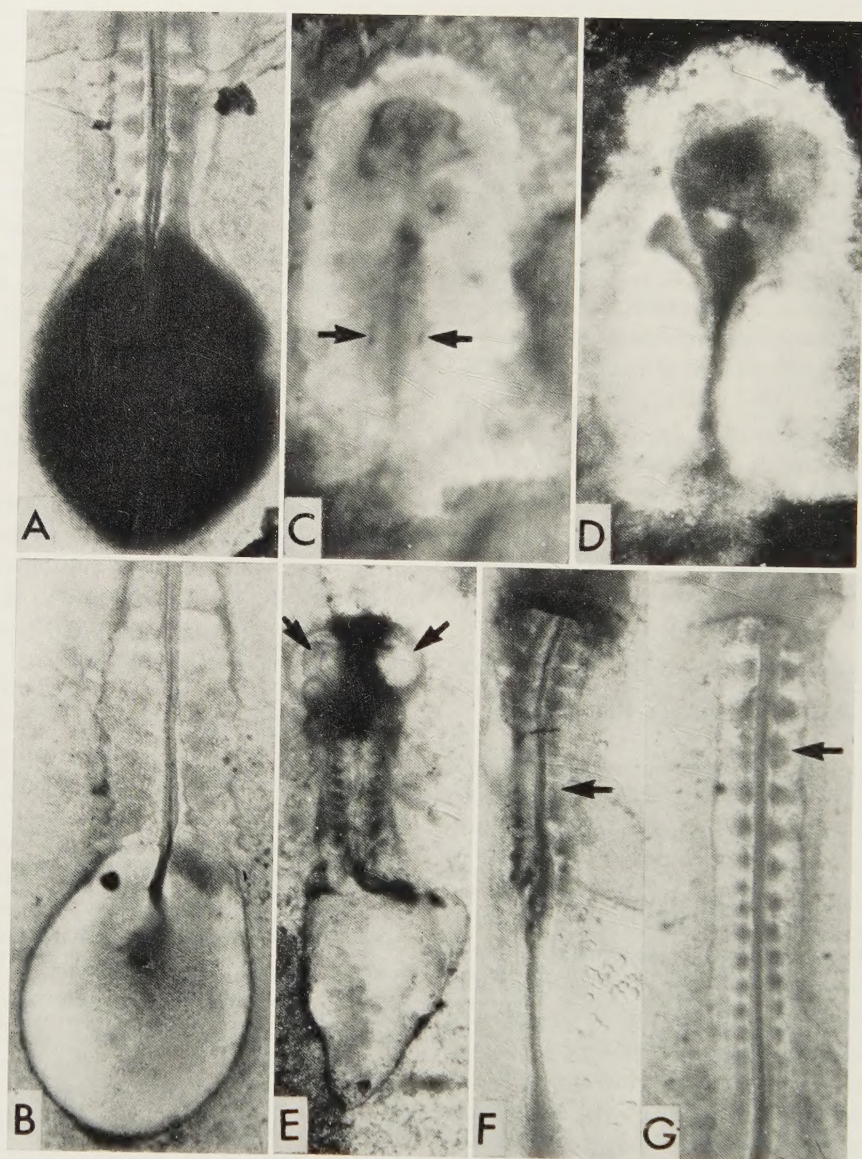


FIG. 2.

- A. Partie postérieure d'un embryon traité *in vitro* au stade 14 somites et cultivé pendant 17 heures en présence de colorant. Vésicule hémorragique. ($\times 40$.)
- B. Partie postérieure d'un embryon traité au même stade et dans les mêmes conditions que celui de la figure A. Vésicule œdémateuse et début d'hémorragie des aortes. ($\times 40$.)
- C et D. Embryon traité au stade prolongement céphalique long. Le colorant a été appliqué pendant 3 heures puis rincé. ($\times 40$.)
- E. Aspect de l'embryon 2 heures après le traitement : la gouttière neurale ne s'est pas constituée, la corde n'est pas allongée. Le matériel mésodermique est resté massé

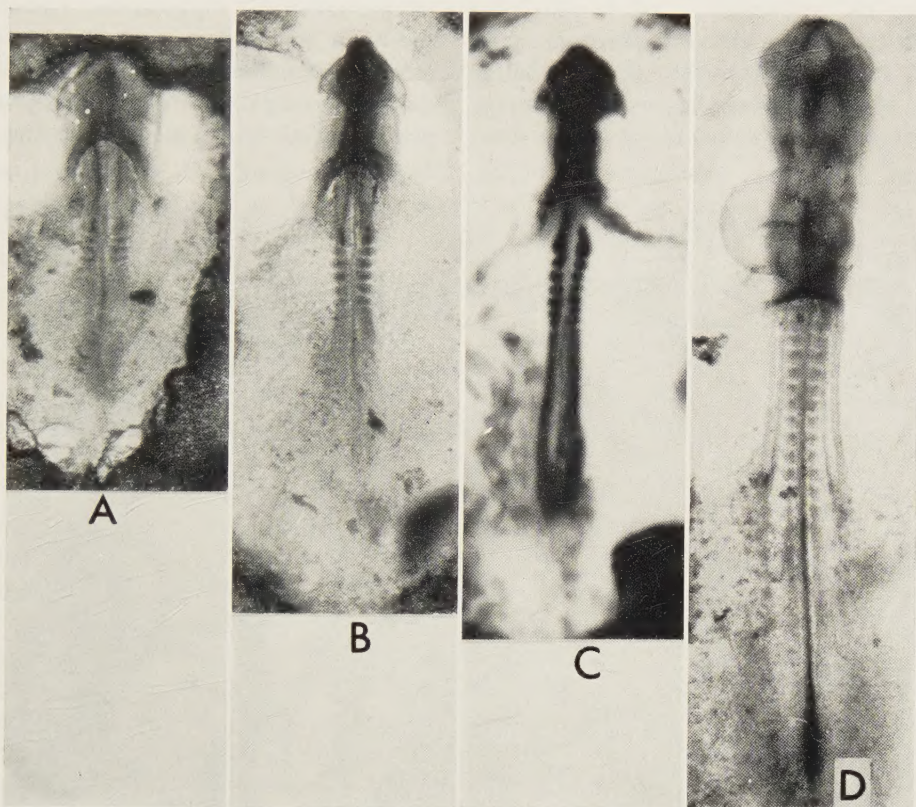


FIG. 3. — Evolution d'un embryon témoin explanté au stade 4 paires de somites. ($\times 25$.)

A. L'embryon après l'explantation.

B, C, D. L'embryon après 3, 5 et 21 heures de culture.
Embryons en vue ventrale.

sous la ligne primitive (flèches). Œdème généralisé. Il reste du colorant dans l'embryon, en particulier au niveau du nœud de Hensen.

D. Aspect de l'embryon 18 heures après le traitement : la morphogenèse est inhibée. Vésicules œdémateuses de part et d'autre de la ligne primitive. Le matériel mésodermique invaginé s'est déplacé vers l'avant et forme deux cordons en arrière de la plaque neurale.

E, F, G. Embryons traités *in vitro* au stade 3 paires de somites. ($\times 40$.)

E. Embryon cultivé pendant 21 heures en présence du colorant : vésicule dans la région postérieure et en arrière de l'embryon, diplocardie (flèches).

F. Embryon rincé après 3 heures de traitement et cultivé 18 heures supplémentaires. Segmentation anormale (flèche), défaut de croissance de la corde, celle-ci s'arrête au niveau des derniers somites.

G. Embryon traité dans les mêmes conditions. Bloc de somites (flèche).

Tous les embryons sont vus par la face ventrale.

début du traitement — est le plus souvent très anormale. On observe, après une vingtaine d'heures, des anomalies qui affectent l'ébauche neurale dont le mouvement de fermeture est arrêté ainsi

ou partiellement diplocardes. L'ébauche somitique forme deux ou trois paires de somites normalement découpés auxquels s'ajoute parfois un segment d'épimère non segmenté ou un bloc de somites. La

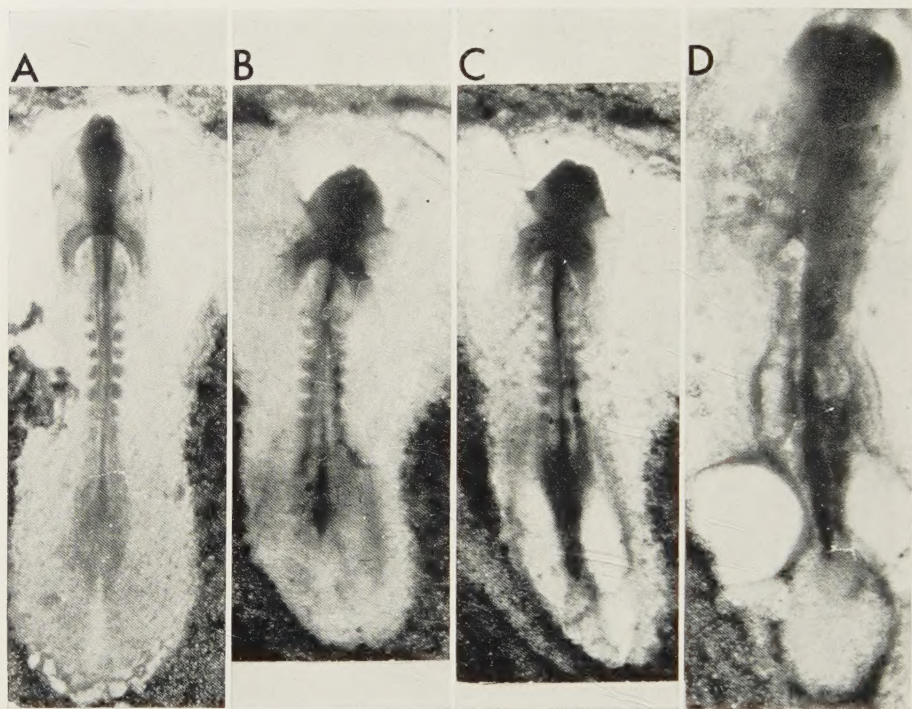


FIG. 4. — Evolution d'un embryon, de même stade que celui de la figure 3, traité pendant 3 heures. ($\times 25$.)

- A. L'embryon après l'explantation.
 B. L'embryon après 3 heures de traitement. Œdème dans la région postérieure où du colorant est resté après le ringage. Du fait de l'œdème, la région antérieure est courbée, d'où son raccourcissement apparent.
 C. L'embryon 2 heures après. Œdème persistant dans la région antérieure, vésicules œdémateuses dans la région postérieure d'où le mésoderme a été chassé. Arrêt de l'élongation.
 D. L'embryon après 21 heures de culture. Seule la partie différenciée s'est allongée. Morphogénèse anormale à l'avant (mal visible). Vésicules œdémateuses.
 Embryons en vue ventrale.

que la croissance longitudinale. Il en va de même pour l'intestin antérieur dont la formation est plus ou moins inhibée. Une conséquence de ce phénomène est que ces embryons sont totalement

région postérieure de la corde comme celle du tube neural ont une élongation très réduite, le bulbe cordal est massif, le sinus rhomboïdal large (fig. 2, E, F et G; fig. 3, et 4).

Lorsque le traitement est appliqué après la trentième heure d'incubation, seule la région postérieure de l'embryon réagit de façon marquée au cours des premières heures du traitement. Il s'agit encore d'œdèmes qui se localisent au niveau des lames segmentaires et latéralement à la ligne primitive (fig. 7, *H*). La région antérieure n'est pas atteinte. Il n'y a pas d'effet immédiat sur les mouvements morphogénétiques, en particulier sur la fermeture du tube neural et l'élongation de l'embryon. Après une dizaine d'heures de traitement, d'autres anomalies apparaissent. La région caudale est déficiente. Cette déficience intéresse d'abord les organes axiaux et plus particulièrement les lames segmentaires. Elle est aggravée, dans la moitié des cas, par la présence d'une vésicule œdémateuse et plus rarement, à ce stade du traitement, par la rupture des aortes, parfois des artères segmentaires en arrière des vaisseaux omphalo-mésentériques (fig. 2, *A* et *B*). Des hémorragies au niveau des vaisseaux vitellins sont exceptionnelles. Lorsque l'œdème dissocie le bourgeon caudal, l'allongement des organes axiaux est supprimé. En plus de ces anomalies, on remarque dans quelques cas la formation de blocs de somites.

2° ASPECTS HISTOLOGIQUES

a) Dégénérescences cellulaires.

Avant la trentième heure d'incubation (stade 9 de HAMBURGER et HAMILTON : 7 paires de somites), le bleu trypan provoque de nombreuses pycnoses dans les régions où apparaissent des altérations morphologiques. Ces dégénérescences apparaissent dès les premières heures

au cours desquelles le colorant est administré. Les premiers signes de pycnoses qui se manifestent dans les noyaux consistent en une dilatation du nucléole et en une condensation de la chromatine qui finit par se rassembler en deux ou trois granules contre le nucléole et à l'intérieur de cet organite (fig. 5, *A*, *C* et *D*). A ce stade, le matériel pycnotique semble souvent être expulsé des cellules sans qu'il y ait eu préalablement cytolysse. On retrouve en effet certains de ces noyaux reliés à leur cellule d'origine par un pont cytoplasmique (fig. 5, *B*). Cet aspect particulier des pycnoses est fréquent lorsque les cellules pycnotiques bordent un espace vide, on ne le retrouve pas dans les cellules pycnotiques des embryons témoins.

Aux stades présomitiques, toutes les ébauches montrent des dégénérescences. Celles-ci sont plus abondantes au niveau de la ligne primitive et au niveau des œdèmes. Après 3 heures de traitement, leur taux est déjà élevé chez les embryons les plus atteints et peut être estimé entre 5 et 10 % des cellules dans les régions les plus sensibles. Après 5 à 6 heures de traitement ces proportions doublent. Elles ne semblent plus varier par la suite. Ou alors il s'agit de variations inférieures à 5 % et qu'il n'est plus possible d'estimer lorsque les pycnoses sont denses, car les noyaux nécrosés deviennent rapidement coalescents.

Chez les embryons traités aux stades 1 à 6 paires de somites, toutes les structures embryonnaires contiennent des cellules pycnotiques. Ces cellules sont les plus nombreuses dans le sinus rhomboïdal, au voisinage immédiat du nœud de Hensen, dans la moitié postérieure des lames segmentaires et dans le mésoderme de la ligne primitive. Les crêtes neurales et l'ectoderme troncal au voisinage immé-

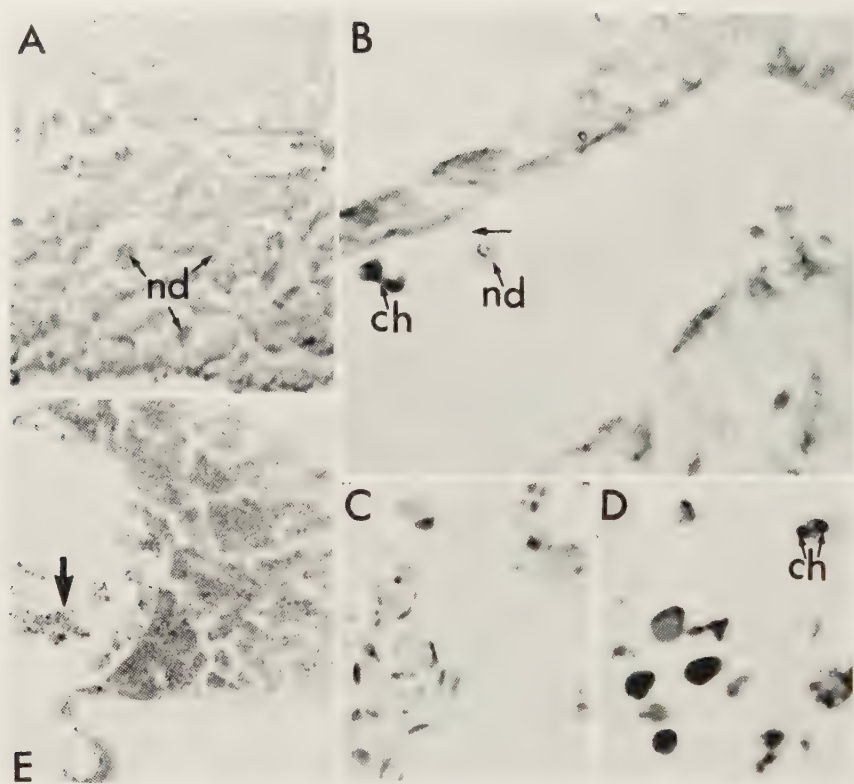


FIG. 5.

A, B, C, D, Anomalies des noyaux au cours de l'interphase chez les embryons traités par le bleu trypan : condensation de la chromatine et dilatation du nucléole. ($\times 600$.)

A. Pycnoses interphasiques dans le mésoderme d'un embryon au stade repli céphalique transverse. Vert de méthyle pyronine.

B. Expulsion de matériel pycnotique. Ectoderme d'un embryon de 5 paires de somites. Vert de méthyle pyronine. Photographié en lumière rouge. La flèche indique un pont cytoplasmique qui relie le nucléole expulsé à sa cellule d'origine. ($\times 750$.)

C. Mésoderme présomitique d'un embryon de 5 paires de somites. Coloration par la méthode de Feulgen. ($\times 750$.)

D. Mésoderme présomitique d'un embryon de 5 paires de somites. Coloration au vert solide à pH 8,1. ($\times 750$.)

nd : nucléole dilaté, ch : chromatine.

E. Activité de la succinodéshydrogénase dans les cellules pycnotiques du mésoderme présomitique d'un embryon de 5 paires de somites. Les cellules pycnotiques (flèches) sont plus réactives que les cellules d'apparence saine. ($\times 750$.)

diat du tube neural sont également très sensibles. Le taux de pycnose est, dans les régions les plus touchées, approximativement le même que chez les embryons

traités au stade présomitique et varie de la même façon. Dans les régions les moins touchées, il s'établit entre 2 et 4 % après 6 heures de traitement.

Les embryons traités plus tardivement ne dégèrent que dans leur région caudale. Chez ces embryons, l'importance des dégénérescences est fort variable. Leur taux atteint exceptionnellement 10 % après 5 à 6 heures chez les embryons les plus jeunes de ce groupe (de 7 à 10 paires de somites), lorsque l'œdème se développe rapidement dans les lames segmentaires. En général, leur taux ne dépasse pas 3 % des cellules au cours des premières heures et retombe ensuite au taux normal (moins de 1 %). A ces stades, on les trouve surtout dans les lames segmentaires. On en trouve en moindre nombre dans le tube neural, le bulbe cordal et le bord interne des lames latérales. Il en apparaît de même et en grand nombre dans la ligne primitive et le bourgeon caudal, mais il s'agit là d'un phénomène normal qui se manifeste également chez les témoins. Après le stade 10 somites, l'importance des dégénérescences induites directement par le traitement est négligeable. Des foyers nécrotiques peuvent s'installer secondairement au voisinage immédiat des hémorragies si le traitement est prolongé plus de 12 heures, mais il ne s'agit pas d'un effet direct du colorant.

b) Autres modifications histologiques.

Lorsque le colorant est administré aux stades présomitiques et à ceux des premiers somites, l'endoderme se décolle dans les régions œdémateuses (fig. 6, A). Aux stades plus tardifs, cet effet est bien plus rare. Par contre, d'autres modifications, qui n'apparaissent que de façon très fugace aux stades précoces en raison de la grande sensibilité des embryons, se

manifestent clairement après la trentième heure d'incubation.

Déjà, l'observation attentive des embryons au cours du traitement montre que les cellules du mésenchyme se mobilisent, avant que les œdèmes soient bien établis, autour ou au voisinage des points de pénétration du colorant.

L'examen histologique des embryons traités peu de temps (3 à 6 h) démontre aussi de tels déplacements localisés au contact immédiat de l'endoderme. De plus, on observe que certaines cavités du mésenchyme se dilatent.

Par ailleurs la structure de l'ectoderme au niveau des lames segmentaires comme au bord du sinus rhomboïdal devient plus lâche. Les espaces intercellulaires sont distendus (fig. 6 C et D). Des fissures peuvent parfois s'installer dans la ligne primitive.

Plus tard, après une dizaine d'heures de traitement, d'autres altérations deviennent apparentes. L'ectoderme des vésicules œdémateuses, lorsqu'il reste proche du mésoderme, conserve une structure normale avec deux couches de noyaux et des espaces intercellulaires qui restent dilatés. Par contre, lorsque l'ectoderme est éloigné du mésoderme, il prend la structure d'un épithélium pavimenteux. Dans les vésicules œdémateuses, le mésoderme, quand il subsiste, se retrouve sous forme de minces et étroites bandelettes qui tapissent l'ectoderme et l'endoderme. Souvent, à ce niveau et à la périphérie des vésicules, les cellules mésodermiques semblent s'arrondir et rétracter leurs prolongements cytoplasmiques. En outre, on observe un déficit en cellules non seulement aux endroits où l'œdème est le plus apparent, mais aussi plus en avant dans les lames segmentaires et latéralement dans les néphrotomes et les lames latérales.

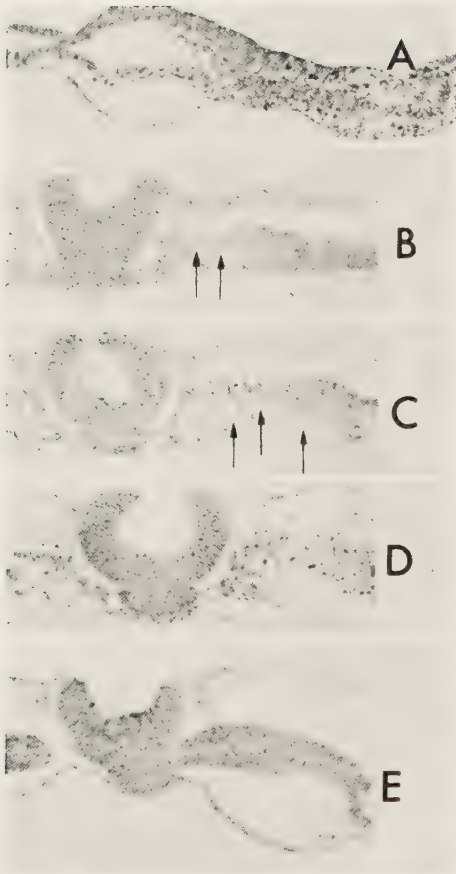


FIG. 6.

- A. Coupe, au niveau du nœud de Hensen, d'un embryon traité dans l'œuf au stade ligne primitive complète et fixé 3 heures après le début du traitement. Accumulation de liquide sous la plaque neurale et entre la couche mésodermique et l'endoderme. ($\times 180$).
- B. Coupe, au niveau du bulbe cordal, d'un embryon témoin (traité 3 heures dans l'œuf par le liquide de Tyrode) de 10 paires de somites. Les flèches indiquent les cavités du mésenchyme. ($\times 180$).
- C. Coupe, au niveau du bulbe cordal, d'un embryon de 12 paires de somites, traité pendant 3 heures dans l'œuf. L'embryon possédait 10 paires de somites au moment du traitement. Début d'œdème qui se marque par l'écartement des cellules du mésenchyme (flèches) et de l'ectoderme. ($\times 80$).
- D. Coupe, au même niveau que précédemment, d'un embryon de 10 paires de somites, traité au stade 6 paires de somites et incubé pendant 6 heures. Œdème dans la lame segmentaire. Dilatation des espaces intercellulaires de l'ectoderme. ($\times 180$).
- E. Coupe, au même niveau que précédemment, d'un embryon de 12 paires de somites, traité au stade 8 paires de somites et fixé après 12 heures de traitement. Vésicule œdémateuse. ($\times 180$).

3° ASPECTS HISTOCHIMIQUES

a) *L'activité de la succinodéshydrogénase.*

Le traitement par le bleu trypan modifie l'activité déshydrogénasique de certains territoires de l'embryon. Les effets varient notablement avec le stade des embryons.

Avant la trentième heure d'incubation, l'activité de la déshydrogénase est fortement augmentée dans l'aire embryonnaire et dans l'embryon. Cet accroissement de l'activité enzymatique est tou-

jours plus marqué dans les régions dont la morphologie est la plus affectée. Ainsi, chez les embryons traités vers la trentième heure d'incubation, l'activité de la déshydrogénase succinique est augmentée surtout dans la région postérieure, là où les œdèmes se forment (fig. 7, A et B).

A ces stades, des modifications nettes de l'activité réductrice des embryons se remarquent après 2 ou 3 heures de traitement pour les plus précocement traités, après 5 heures chez les plus âgés.

Après la trentième heure d'incubation,

les résultats sont moins homogènes. Les embryons augmentent leur activité réductrice seulement lorsqu'ils paraissent affectés dans leur morphologie par l'action du colorant. Cet accroissement de l'activité enzymatique semble plus discret car, à ces stades, les capacités réductrices des embryons normaux sont moins fortes qu'aux stades plus précoces, elles sont aussi plus variables (fig. 7, C et D).

L'activité au niveau des vésicules œdémateuses n'a pas été observée avec précision dans tous les cas, car les feuillettes se désagrègent à ces endroits, au cours de l'incubation *in toto* des embryons.

A quelque stade que ce soit, l'activité de l'aire extra-embryonnaire reste inchangée.

Le traitement avant la trentième heure d'incubation n'affecte pas seulement l'activité physiologique des mitochondries, elle modifie aussi leur forme qui devient plus globuleuse. En revanche, des mitochondries toujours actives accompagnent les noyaux pycnotiques (fig. 5, E). Ces altérations s'observent dans les trois feuillettes de l'embryon.

En conclusion, le colorant augmente l'activité de la succinodéshydrogénase des cellules dans les régions qui sont les plus sensibles au colorant. Il est possible que l'activité de cette enzyme soit augmentée aussi dans les régions saines, comme cela paraît être le cas pour l'activité respiratoire (KAPLAN et JOHNSON, 1968), mais cela n'apparaît pas avec la technique employée.

b) *L'activité de la phosphatase acide.*

Chez les embryons normaux, la répartition de l'activité enzymatique est telle que l'ont décrite d'autres auteurs (MOOG,

1944; TURCHINI et coll., 1961-1967; BECK, 1965).

Chez les embryons traités par le bleu trypan, l'activité de l'enzyme ne paraît pas modifiée; les cellules se colorent avec la même intensité que chez les témoins quels que soient l'âge et l'état des embryons ou la méthode de coloration.

c) *Activités phosphatasiques alcalines.*

Action du bleu trypan sur la formation des dépôts de phosphate de calcium.

Dans un travail préliminaire (LANOT, 1969 b), j'ai pu montrer que l'activité phosphatasique alcaline qui prédomine chez les embryons aux stades utilisés est vraisemblablement une activité ATPasique, liée au métabolisme cellulaire. En effet, les embryons normaux réagissent positivement si on les soumet à la réaction de Stoelzner (méthode de Gomori) sans incubation préalable dans un milieu de composition définie.

L'incubation des embryons en présence de glycérophosphate ou d'ATP ne change pas la coloration des tissus. Cependant, on trouve bien plus de phosphate de calcium dans le coelome extra-embryonnaire lorsque les embryons sont incubés vivants en présence d'ATP. De plus, la coloration spontanée des embryons peut être diminuée s'ils sont traités par un inhibiteur des activités ATPasiques. Enfin, il est possible de mettre en évidence une activité ATPasique importante chez des embryons dont l'activité phosphatasique alcaline est inhibée par la cystéine et dont les dépôts de phosphate sont supprimés par un traitement chimique (nitrate d'argent, puis hypofluorite).

Les effets du colorant ont été recher-

chés sur des embryons à divers stades, fixés après 5 à 6 heures de traitement dans l'œuf puis colorés, et sur des embryons qui ont été soumis à l'action du nitrate d'argent, incubés en présence d'ATP et de cystéine et rincés à l'hyposulfite après le traitement par le colorant. Ces derniers traitements n'ont été appliqués qu'à des embryons de 48 heures d'incubation; ils rendent les embryons plus jeunes excessivement fragiles.

Les embryons fixés immédiatement après le traitement, puis colorés, réagissent plus fortement que les témoins, mais uniquement au niveau des œdèmes.

Cette réaction se traduit par un dépôt de phosphate extra-cellulaire à l'endroit précis de l'œdème; d'autre part, la coloration des membranes des cellules ectodermiques et endodermiques est augmentée. Cet effet est particulièrement bien marqué chez les embryons de 48 heures d'incubation (fig. 7, *I à L*).

Lorsque le phosphate de calcium préformé est supprimé, les embryons traités par le bleu trypan réagissent de la même façon que les témoins. La quantité d'ATP-ase présente n'est pas augmentée, c'est donc l'activité des cellules qui est accrue.

FIG. 7.

A à F. Répartition de l'activité succinodéshydrogénasique chez les embryons témoins et chez les traités.

A. Embryon témoin (traité dans l'œuf au stade 7 paires de somites, par le liquide de Tyrode) de 11 paires de somites. ($\times 25$.)

B. Embryon traité par le bleu trypan au stade 6 paires de somites et fixé 5 heures plus tard au stade 11 paires de somites. Œdème dans la région postérieure. A ce niveau, l'activité enzymatique est plus intense. ($\times 25$.)

C. Embryon témoin de 20 paires de somites, traité 5 heures par le liquide de Tyrode. ($\times 25$.)

D. Embryon de 21 paires de somites, traité 5 heures par le bleu trypan. Activité plus forte au niveau du bourgeon caudal et des lames segmentaires. ($\times 25$.)

E. Coupe, au niveau du sinus rhomboïdal, d'un embryon témoin de 5 paires de somites, traité 5 heures par le liquide de Tyrode. ($\times 900$.)

F. Coupe au même niveau, chez un embryon traité de même stade, incubé 5 heures en présence du colorant. Activité plus forte chez l'embryon traité. ($\times 900$.)

G et H. Répartition de l'activité phosphatasique acide.

G. Embryon témoin de 8 paires de somites, traité 3 heures par le liquide de Tyrode. ($\times 25$.)

H. Embryon de 7 paires de somites, traité 3 heures par le bleu trypan. Œdème bilatéral. Réactivité analogue à celle de l'embryon témoin. ($\times 25$.)

I à L. Activité ATP-ase des embryons.

I. Région caudale d'un embryon témoin de 15 paires de somites, traité pendant 4 heures par le liquide de Tyrode. Mise au point sur l'ectoderme. ($\times 180$.)

J. Même région chez un embryon de 14 paires de somites, traité pendant 4 heures par le bleu trypan. Mise au point sur l'ectoderme dont les cellules sont plus chargées de phosphate de calcium que celles du témoin. ($\times 180$.)

K. Endoderme de la région moyenne des lames segmentaires chez un témoin de 10 paires de somites, traité pendant 5 heures par le liquide de Tyrode. ($\times 750$.)

L. Endoderme de la même région chez un embryon de même stade traité 5 heures par le bleu trypan. ($\times 750$.)



FIG. 7.

II. — SENSIBILITÉ DES EMBRYONS EN FONCTION DU STADE ET DE LA DURÉE DU TRAITEMENT

Des études préliminaires, il résulte que la sensibilité des embryons dépend de la dose de colorant. Ainsi, à la concentra-

l'œuf se dilue dans le liquide sous-germinal.

L'application de 5/100 de ml de solution de BT *in vitro* se traduit, après 12 heures de traitement, par environ 50 % d'anormaux. Ainsi s'expliquent les différences qu'on observe entre les em-

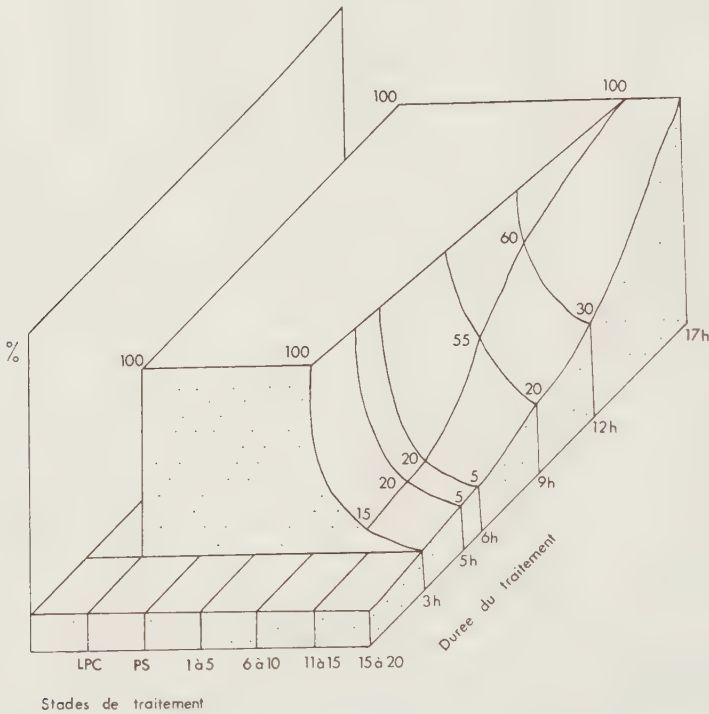


Fig. 8. — Variation du taux d'œdème en fonction du stade de traitement et de la durée du traitement.

LPC : ligne primitive complète; SP : stades présomitiques.

1 à 5 : stades 1 à 5 paires de somites; 6 à 10 : stades 6 à 10 paires de somites, etc.

tion utilisée, il est nécessaire d'administrer 5/100 de ml aux embryons de plus de 40 heures d'incubation pour obtenir environ 30 % d'embryons anormaux après 12 heures de traitement.

Cet effet est obtenu *in vitro* avec 3/100 de ml de solution colorée. Ceci est dû au fait que la solution injectée dans

bryons traités dans l'œuf et ceux qui le sont en culture *in vitro*.

Si, pour chaque stade de traitement considéré, on calcule le pourcentage d'anomalies d'un type déterminé à différentes périodes du traitement, il est possible d'obtenir une image claire de la sensibilité des embryons en fonction des

deux variables : stade de traitement et durée du traitement.

Ces données ont été calculées à partir d'embryons traités *in vitro* et observés après 3, 5, 6, 9, 12 et 17 heures de traitement. Pour chaque série ont été calculés le pourcentage d'œdèmes, celui d'inhibition des mouvements morphogé-

quement vers la trentième heure d'incubation. Cependant, si le traitement est prolongé, tous les embryons finissent par réagir dans les séries considérées. Cet abaissement de la sensibilité va de pair, remarquons-le, avec une localisation de plus en plus précise des œdèmes. Sans doute ces faits traduisent-ils un

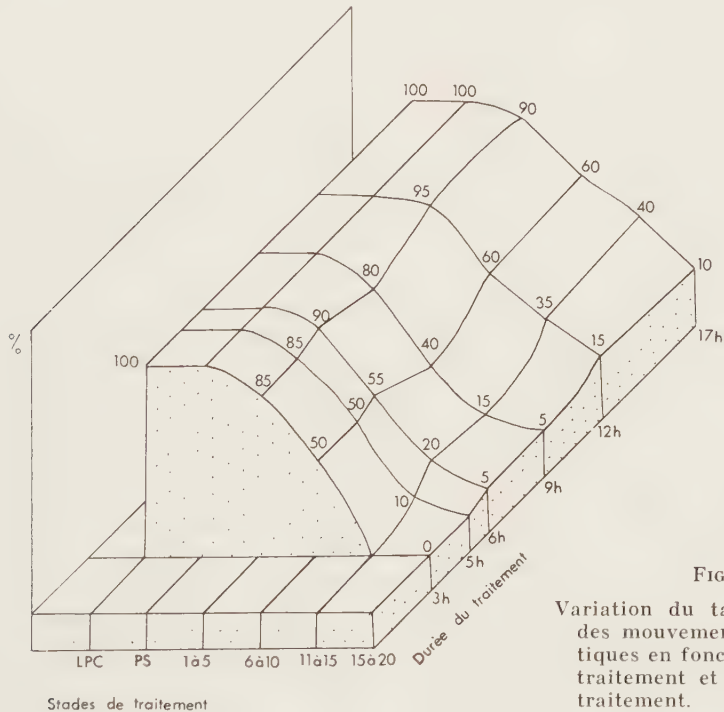


FIG. 9.

Variation du taux d'inhibition des mouvements morphogénétiques en fonction du stade de traitement et de la durée du traitement.

netiques (ce terme étant pris dans un sens très large), enfin celui des anomalies de l'ébauche somitique. Les résultats sont donnés sur des blocs diagrammes (fig. 8, 9 et 10).

A l'examen de ces graphiques, il apparaît d'abord que l'œdème est l'altération la plus fréquente dans toutes les séries. A ne considérer qu'elle, il est évident, en dépit du nombre assez restreint d'embryons examinés, que la sensibilité précoce des embryons diminue très brus-

quement important dans la physiologie de l'embryon.

Les altérations des mouvements morphogénétiques sont immédiates tant que le bourgeon caudal n'est pas ébauché. Chez les embryons traités plus tardivement, le défaut d'élongation ne se manifeste que dans les cas d'atteinte sévère où le bourgeon caudal se désorganise sous l'effet d'une vésicule hémorragique.

Les altérations de l'ébauche somitique : déficience marquée du matériel présomi-

tique, réduction du nombre de somites, absence ou arrêt de la différenciation des somites (aux stades les plus précoces), formation de blocs de somites, sont surtout fréquents lorsque le traitement est appliqué à des embryons jeunes avant le stade 6 somites. Ensuite la sensibilité

bryons pris à divers stades, de 4 à 20 paires de somites. Deux constatations préalables doivent être faites. Première-ment, lorsque l'œdème est apparu, il ne régresse jamais totalement; mais si l'embryon n'est mis que quelques heures en présence du colorant, l'importance de

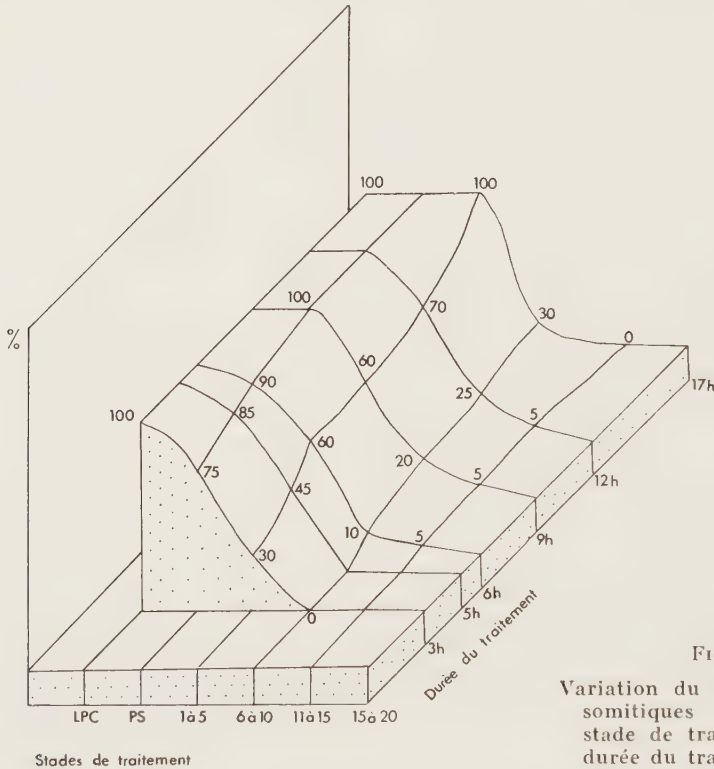


FIG. 10.
Variation du taux d'anomalies somitiques en fonction du stade de traitement et de la durée du traitement.

de l'ébauche somitique diminue nettement.

La plupart des anomalies décrites pourraient être dues à la présence de l'œdème; ainsi le blocage des mouvements morphogénétiques et, aux stades les plus tardifs, les hémorragies. Que se passe-t-il si l'on empêche l'œdème de se développer en reportant les embryons en milieu normal ?

L'expérience a été pratiquée sur 22 em-

l'œdème est très restreinte. Deuxièmement, des anomalies apparaissent tardivement en dehors de la région œdéma-teuse ou au niveau d'un œdème très peu important.

Dans ces cas, les mouvements morpho-génétiques se font normalement (fig. 2, F et G). Leur inhibition dans les cas de traitement prolongé traduit, d'une part, la grande sensibilité des germes aux stades considérés et, d'autre part, elle

reflète l'existence de l'état œdémateux.

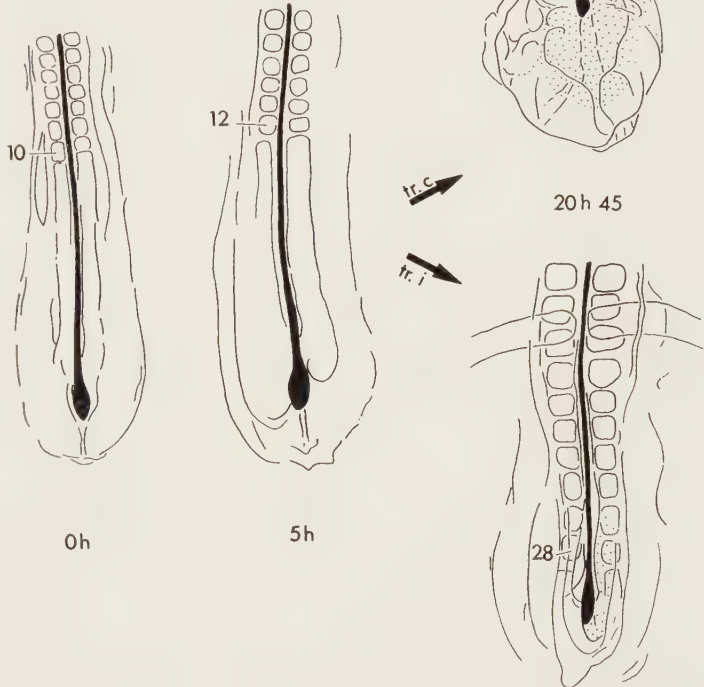
Mais les embryons traités brièvement montrent encore des altérations : déficiences plus ou moins étendues et blocs de somites lorsqu'ils sont traités avant la trentième heure d'incubation, hémorragies pour ceux qui le sont plus tardivement (fig. 5).

FIG. 11.

Evolution de deux embryons traités au stade 10 paires de somites. Œdème au niveau des lames segmentaires après 5 heures de traitement; jusqu'à ce moment, les deux embryons ont eu une évolution identique.

Dans un cas, le traitement est interrompu (*Tr. i.*); après 21 heures, œdème léger au niveau des plaques somitiques, dilatation et hémorragie des aortes.

Dans l'autre cas, le traitement est continu : après 21 heures, vésicules hémorragiques, lame segmentaire dissociée, somites de taille réduite, ligne primitive conservée.



III. — L'ACTION DU BLEU TRYPAN SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE AU COURS DU TRAITEMENT

Passé le stade 10 somites, il n'est plus possible d'expliquer les déficiences importantes des lames segmentaires, ou d'autres territoires moins affectés, par une action mécanique de l'œdème qui repousserait les cellules comme au cours des stades précoces. En ce qui concerne

le tube neural, cette hypothèse est exclue de toute façon, car les cellules neurales sont solidaires les unes des autres et ne peuvent pas être mobilisées. Aux stades tardifs, le BT ne semble pas avoir une action nécrosante très importante. Agit-il sur la croissance cellulaire ? Cette action éventuelle est-elle spécifique ou ne fait-elle que traduire un état de souffrance général ?

L'action du BT sur la croissance des

cellules de l'embryon a été étudiée par deux méthodes complémentaires :

— la comparaison des index mitotiques chez les embryons traités et chez les témoins;

— la comparaison des quantités d'ADN.

A. — COMPARAISON DES INDEX MITOTIQUES

Les index mitotiques ont été établis dans deux séries différentes.

Dans l'une, les comptages ont été faits uniquement dans l'ébauche somitique à différents niveaux chez des embryons témoins et traités de même stade. Dans l'autre, les dénombrements ont été réalisés à l'extrémité postérieure des organes axiaux, seule région réellement comparable chez des embryons de stades différents. Les embryons ont été traités au même stade par le liquide de Tyrode ou la solution de BT, et fixés après des intervalles de temps différents.

PREMIÈRE SÉRIE

Les 4 embryons de cette série ont été traités dans l'œuf par 0,03 ml de bleu trypan au stade prolongement céphalique long. Ils avaient formé 4 ou 5 paires de somites au moment de la fixation, 5 h 30 à 6 heures plus tard. Deux groupes de témoins ont été considérés, l'un comprend 4 embryons normaux fixés au stade 4 ou 5 paires de somites (témoins absolus), l'autre 4 embryons traités par le liquide de Tyrode dans les mêmes conditions que ceux traités par le bleu trypan.

Les embryons de ce dernier groupe avaient atteint les mêmes stades, au début et à la fin de l'expérience, que ceux sou-

mis à l'action du colorant. Les comptages ont été faits, dans cette série, sur des coupes parasagittales.

Les embryons traités par le bleu trypan présentent tous des anomalies, œdèmes, blocs de somites, inhibition des mouvements morphogénétiques, de sorte que la longueur de l'ébauche somitique varie fortement d'un embryon à l'autre.

En raison de ces altérations, il a paru nécessaire d'effectuer les dénombrements à des niveaux déterminés par rapport aux structures définies des embryons (les derniers somites et le bulbe cordal).

Chez les embryons traités comme chez les témoins, les comptages ont donc été faits à six niveaux différents :

— à celui des derniers somites (F), à l'extrémité antérieure de la lame segmentaire (E), à une distance d'une somite en arrière du niveau précédent (D), au milieu de la lame segmentaire (C), à une distance d'un somite en avant du bulbe cordal (B), à hauteur du bulbe cordal (A). Les noyaux ont été comptés des deux côtés de chaque embryon. Seuls ceux d'apparence saine ont été retenus pour établir l'index mitotique. En effet, les cellules en dégénérescence interphasique ne peuvent plus se diviser.

Les résultats sont consignés dans les tableaux I et II. On notera la très grande variabilité tant du nombre de cellules que de l'index mitotique. Cependant, l'examen attentif de chaque lame segmentaire montre que la moitié antérieure de la lame segmentaire contient plus de cellules que la moitié postérieure. En outre, l'index mitotique est plus élevé dans le dernier somite et à l'apex de la lame segmentaire, mais seulement au moment où un somite se forme. Dans ce dernier cas l'index mitotique peut dépasser très fortement la valeur moyenne, dans un cas il atteint 16 %.

TABLEAU I. — MOYENNE DU NOMBRE DE CELLULES SAINES
(Les nombres entre parenthèses indiquent la variation du nombre de cellules
entre deux niveaux.)

Niveaux	Témoins absolus	Témoins Tyrode	Bleu trypan
A	101,8 $\pm$ 23,6 (+5,3 %)	104 $\pm$ 46,8 (-5,5 %)	126,87 $\pm$ 15,5 (+20,2 %)
B	108,2 $\pm$ 26,1 (-1,1 %)	98,2 $\pm$ 38,7 (+28,9 %)	155 $\pm$ 13 (-13,4 %)
C	107 $\pm$ 26,3 (+3,2 %)	126,6 $\pm$ 37,5 (+15,7 %)	134,12 $\pm$ 26,6 (+20,2 %)
D	110,5 $\pm$ 28,7 (+16,5 %)	146,5 $\pm$ 33,6 (+9,5 %)	161,25 $\pm$ 15,4 (+0,6 %)
E	128,8 $\pm$ 27,5 (+10 %)	160,5 $\pm$ 27,4 (+6,4 %)	162,31 $\pm$ 21,4 (+3,5 %)
F	141,7 $\pm$ 21,4	170,8 $\pm$ 17,4	168,12 $\pm$ 20

TABLEAU II. — MOYENNES DES INDEX MITOTIQUES

Niveaux	Témoins absolus	Témoins Tyrode	Bleu trypan
A	3,52 $\pm$ 1,94	3,71 $\pm$ 2,25	4,01 $\pm$ 1,59
B	3,13 $\pm$ 2,81	3,58 $\pm$ 2,48	4,36 $\pm$ 1,30
C	4,60 $\pm$ 1,37	3,60 $\pm$ 3,27	4,05 $\pm$ 1,55
D	3,72 $\pm$ 2,14	4,39 $\pm$ 2,17	3,53 $\pm$ 0,93
E	7,01 $\pm$ 4,13	5,31 $\pm$ 4,96	7,06 $\pm$ 1,97
F	9,63 $\pm$ 3,33	9,93 $\pm$ 2,11	7,81 $\pm$ 1,62

Chez les embryons traités par le bleu trypan, la densité cellulaire est augmentée, surtout si l'on tient compte des cellules pycnotiques (celles-ci représentent, dans la moitié postérieure, jusqu'à 20 % du nombre total de cellules). Ceci est d'ailleurs apparent au simple examen des embryons.

Il n'y a pas de différence significative entre les index mitotiques des embryons traités et ceux des témoins. De même, le rapport du nombre de prophases à celui des post-prophases n'est pas significativement modifié. En outre, chez les embryons traités par le bleu trypan, on

ne trouve pas plus d'anomalies mitotiques que chez les témoins.

Dans cette expérience, le bleu trypan n'agit pas spécifiquement sur le déroulement de la mitose.

SECONDE SÉRIE

Les résultats de la seconde série (tableau III) montrent qu'il n'apparaît pas de modification de l'index mitotique, même si le traitement est prolongé. Le colorant n'est pas une substance anti-mitotique. De même, aux stades étudiés,

TABLEAU III. — VARIATIONS DE L'INDEX MITOTIQUE ET DU TAUX DE PYCNOSES AU COURS DU TRAITEMENT CHEZ LES EMBRYONS TRAITÉS A 10 PAIRES DE SOMITES

Durée du traitement	Traitement	Index mitotique	Index pycnotique	
3 heures (13 s.).	Bleu trypan	4 %	3 %	Lames segmentaires.
		5 %	3 %	Corde.
		11 %	2 %	Tube neural.
	Tyrode	4 %	0 %	Lames segmentaires.
		2 %	1 %	Corde.
		7 %	0 %	Tube neural.
6 heures (14 s.).	Bleu trypan	2 %	1 %	Lames segmentaires.
		5 %	0 %	Corde.
		5 %	0 %	Tube neural.
	Tyrode	5 %	0 %	Lames segmentaires.
		1 %	0 %	Corde.
		3 %	0 %	Tube neural.
9 heures (14 s.).	Bleu trypan	6 %	0 %	Lames segmentaires.
		0 %	0 %	(surface : 6 553 μ^2).
		3 %	0 %	Corde.
12 heures (23 s.).	Bleu trypan	2 %	0 %	Tube neural.
		2 %	0 %	(surface : 786 μ^2).
		3 %	1 %	Corde.
	Tyrode	2 %	0 %	Tube neural.
		1 %	0 %	(surface : 14 962 μ^2).
		5 %	0 %	Lames segmentaires.
				(surface : 7 106 μ^2).
				Corde.
				Tube neural.
				(surface : 9 765 μ^2).

le taux de pycnose n'est jamais significativement plus élevé que chez les témoins. Cependant, l'embryon traité 12 heures, qui présente un œdème peu prononcé dans sa partie caudale, possède à ce niveau des lames segmentaires déficientes. Les déficiences sont telles qu'elles ne peuvent être expliquées par une inhibition de la croissance cellulaire. En effet, dans le cas normal, au niveau où sont faits les dénombrements, la quantité de matériel est multipliée par cinq environ entre les stades 10 à 23 somites, si l'on considère que, la densité cellulaire restant la même, la surface de sec-

tion de la lame segmentaire s'accroît d'un quart alors que la lame segmentaire s'allonge d'environ quatre fois sa longueur d'origine ($4 \times \frac{5}{4} = 5$). Chez l'embryon traité, la quantité de cellules est réduite au 1/10 de sa valeur initiale. Même un arrêt total et permanent des divisions cellulaires ne peut expliquer cet effet. Il faut donc supposer qu'il y a des remaniements tissulaires, sans doute des migrations. Néanmoins, il se peut que le rythme des divisions soit ralenti sans que cela se traduise dans l'index mitotique.

B. — ÉTUDE DES QUANTITÉS D'ADN

Les mesures ont été faites sur des embryons de 4 à 5 somites au niveau des derniers somites, à celui du mésoderme paraxial à hauteur du nœud de Hensen et dans le tissu neural pris à la même hauteur. Les résultats ont été reportés sur des histogrammes.

et la valeur tétraploïde, et 12 % de cellules dont la charge en ADN est supérieure à la valeur tétraploïde moyenne des mesures (ces cellules sont tétraploïdes). Si l'on admet que les valeurs diploïdes et tétraploïdes se distribuent normalement autour de chacune des moyennes, il y aurait donc 64 % de cellules diploïdes, 24 % de cellules tétraploïdes et 12 % de cellules en cours de

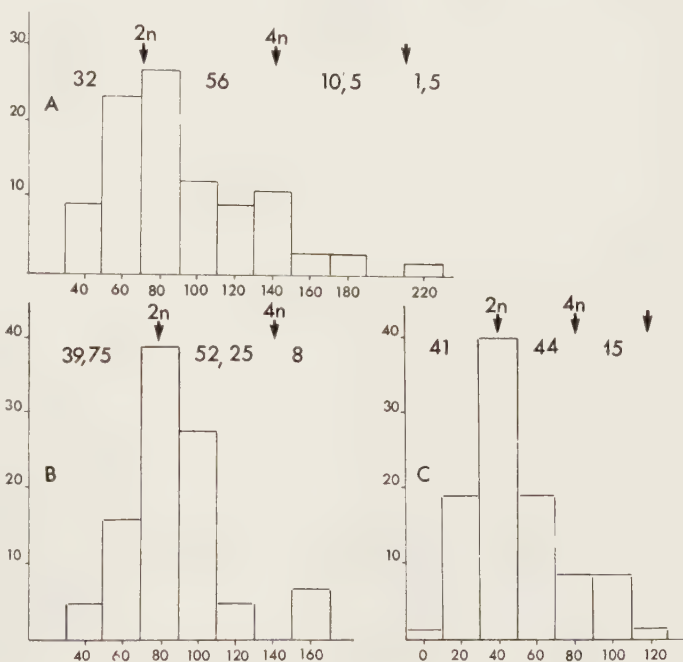
FIG. 12.

Répartition de la teneur en ADN dans les noyaux des cellules du mésoderme paraxial au voisinage du nœud de Hensen.

A. Embryon témoin : 64 noyaux mesurés.

B. Embryon traité au bleu trypan; plage fortement nécrosée : 44 noyaux mesurés.

C. Embryon traité au bleu trypan; plage d'apparence saine : 68 noyaux mesurés.



RÉSULTATS

Dans le mésoderme de l'embryon normal, les teneurs en ADN des noyaux se répartissent de la même façon quel que soit le niveau envisagé. On trouve dans chaque cas environ 32 % de cellules dont la teneur en ADN est inférieure à la valeur diploïde moyenne des mesures (ces cellules sont évidemment diploïdes), 56 % pour lesquelles les quantités d'ADN se répartissent entre la valeur diploïde

synthèse. Il semble que le tissu neural possède une plus forte proportion de cellules diploïdes, mais, comme nous l'avons vu, les mesures manquent de précision dans ce dernier cas.

Chez l'embryon traité, le taux de cellules diploïdes est augmenté dans le mésoderme et dans la plaque neurale. Ainsi, le taux de cellules dont les quantités d'ADN sont inférieures à la valeur diploïde estimée est toujours supérieur à 39 %. De même, la classe de noyaux

qui possèdent la valeur diploïde moyenne est plus importante que chez l'embryon témoin. La proportion de noyaux à valeur intermédiaire entre les valeurs diploïde et tétraploïde moyennes est abaissée. C'est aussi le cas des noyaux tétraploïdes sauf dans un cas (région saine de la lame segmentaire).

Il n'y a pas d'excès de cellules tétraploïdes : les cellules qui ont fait leur synthèse se divisent. Au contraire, les taux de cellules tétraploïdes et de cellules en cours de synthèse sont abaissés. Bien qu'il n'empêche pas l'entrée des cellules en mitose, il semble donc que le traitement retentisse sur la synthèse des ADN. A la longue, ceci devrait se traduire par un abaissement de l'index mitotique; or rien de tel n'est constaté après un traitement de longue durée chez les embryons de plus de 10 somites. Il est vraisemblable que cet effet du colorant est transitoire. Il suffirait cependant à expliquer les défauts de croissance observés chez les embryons traités après le stade 7 paires de somites.

IV. — ACTION SUR LA FORMATION DES SOMITES

En arrière de son apex, la lame segmentaire n'est pas déterminée pour former des somites de rang défini (LANOT, 1967-1969 *a*). Cette détermination s'établit progressivement de l'avant vers l'arrière. Bien que les derniers somites différenciés et l'apex de la lame segmentaire puissent transmettre cette détermination, ce sont surtout la corde et le tube neural qui en sont responsables, car c'est au contact de ces structures que se détermine le niveau auquel se forme chaque somite.

Si le bleu trypan interfère avec l'action qu'exercent les organes axiaux sur le

mésoderme présomitique, cet effet doit apparaître plus nettement en isolant la lame segmentaire de la corde et du tube neural.

L'expérience peut être réalisée facilement dans l'œuf. Cependant, le fait de couper le blastoderme suffit à modifier la répartition du liquide sous-germinal. En

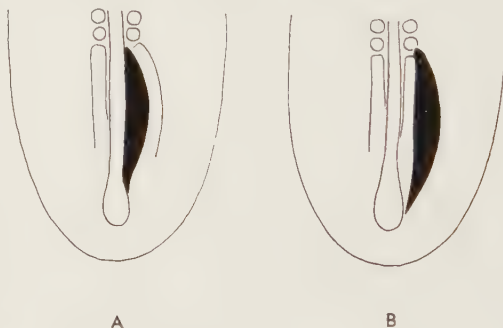


FIG. 13. — Schéma des opérations réalisées sur les embryons traités par le bleu trypan.

A. Séparation de la lame segmentaire d'avec la corde et le tube neural.

B. Séparation de la lame segmentaire d'avec les lames latérales.

général, peu de temps après l'opération, la cavité sous-germinale est comblée par du jaune qui converge vers la latebra et remonte sous l'embryon, sous l'effet de la tension de la membrane vitelline. Le liquide sous-germinal s'écoule alors latéralement sous la membrane vitelline. Pour traiter efficacement les embryons dans de telles conditions, il est nécessaire d'injecter une plus grande quantité de la solution de colorant. De la sorte, il reste toujours assez de colorant en contact avec l'embryon pendant toute la durée de l'expérience.

Celle-ci consiste à injecter 4/100 de ml d'une solution de bleu trypan à 1 % dans la cavité sous-germinale, puis dans une première série à séparer la lame segmentaire droite du tube neural et de

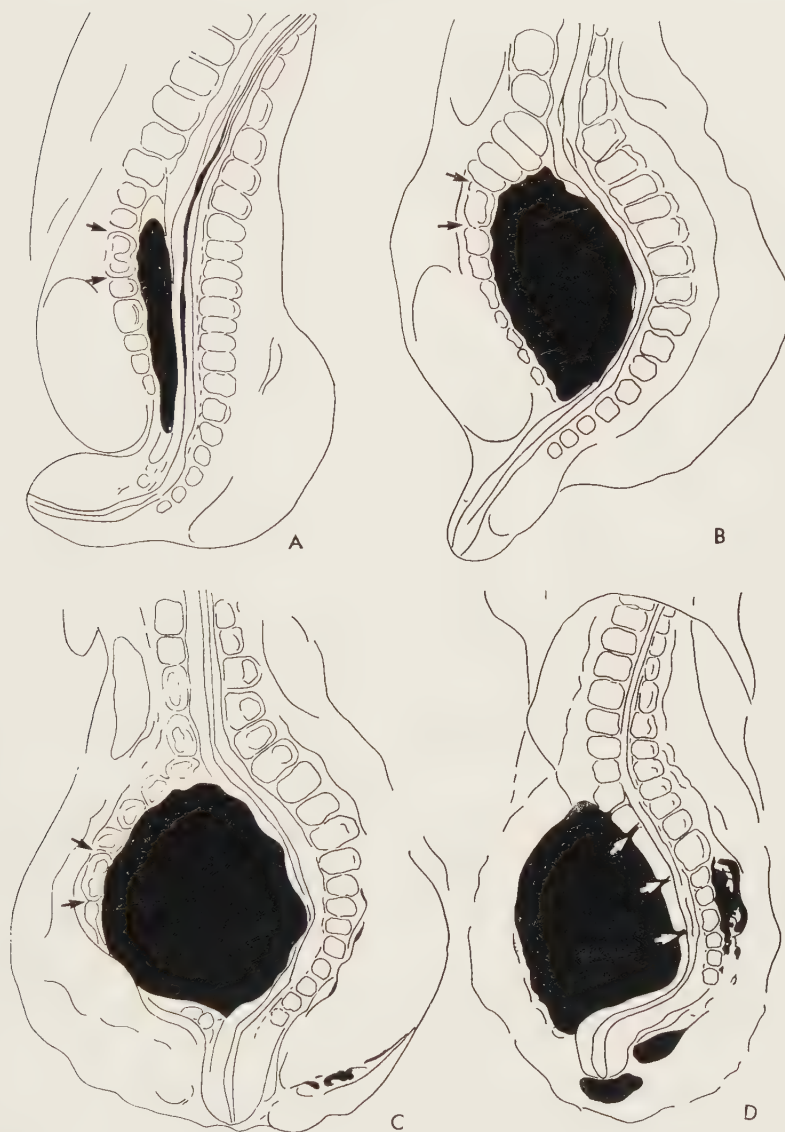


FIG. 14. — Effets du bleu trypan sur les lames segmentaires isolées de l'axe (A, B et C) ou des lames latérales (D).

Les flèches indiquent les blocs de somites.

Il ne paraît pas y avoir de différences entre les deux séries expérimentales.

la corde. Dans une seconde série (expérience témoin), on a séparé la lame segmentaire droite d'avec les lames laté-

rales, l'embryon recevant la même quantité de bleu trypan que dans le cas précédent (fig. 13).

Il y a peu de différence entre les deux séries. Si l'on ne tient compte que de la formation de blocs de somites, on relève que, dans la première série, 8 embryons sur 12 présentent de tels blocs. Dans la seconde série, on en compte 7 cas sur 14.

Les organes axiaux n'exercent pas d'effet protecteur; il est donc légitime de conclure que le colorant agit simplement sur le mésenchyme présomitique.

Il ressort, en outre, de ces résultats que la formation de blocs de somites est plus fréquente dans ces deux expériences, où le mésenchyme est atteint directement, que lorsque les embryons sont intacts. On constate aussi que l'action du colorant est en général très localisée. Les blocs de somites correspondent généralement à deux somites normaux, plus rarement à trois.

Le bleu trypan n'agit pas en modifiant la compétence du mésenchyme puisque des blocs de somites peuvent même se former à l'avant de la lame segmentaire. Normalement, les somites y sont déjà déterminés.

L'hypothèse qui me paraît la plus plausible est que le colorant gêne la mise en place des cellules au moment où le somite se constitue. Cette hypothèse s'accorde avec le fait qu'il existe tous les intermédiaires possibles entre un bloc de somites à structure uniforme et deux ou plusieurs

somites jointifs, délimités par des sillons plus ou moins profonds (fig. 14).

Il est curieux de constater que le phénomène se manifeste sur un court segment seulement, bien que toute la lame segmentaire soit traitée de la même façon. Cette observation pourrait indiquer que le colorant n'est actif que pendant une période brève qui durerait 2 ou 3 heures. Mais le niveau auquel se forme un bloc de somites est quelconque. Cela signifie que le bleu trypan n'agit pas de façon uniforme. La localisation des blocs de somites ne dépend pas du traitement, lequel est appliqué de façon uniforme, mais d'une sensibilité particulière de certaines zones de la lame segmentaire.

Il est peu vraisemblable que cette sensibilité soit localisée une fois pour toutes à certaines régions. Peut-être les cellules sensibles fixent-elles le colorant plus que les autres. De telles différences dans l'aptitude à fixer le colorant existent dans les cellules de l'endoderme (LANOT, 1969 c) et aussi de l'ectoderme, elles sont liées à l'activité physiologique des cellules. Sans doute en est-il de même pour les cellules mésodermiques. Leur sensibilité dépendrait, dans cette hypothèse, de leur état physiologique momentané. Remarquons que cet état n'est pas impliqué dans la formation de l'épithélium somitique.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Chez l'embryon de Poulet, l'application de bleu trypan, au cours des trois premiers jours de l'incubation, détermine l'apparition de deux catégories d'altérations :

d'une part, des œdèmes;

d'autre part, des altérations de la morphogenèse.

a) Les œdèmes :

Les œdèmes se forment à tous les stades étudiés. A la suite d'un traitement fait avant la trentième heure d'incubation, ils se manifestent rapidement dans toute l'aire transparente et même à la limite interne de l'aire opaque, par une

accumulation de liquide sous l'endoderme et sous l'ectoderme. Après un traitement plus tardif, on assiste à une dilatation des espaces intercellulaires dans l'ectoderme et le mésoderme, au niveau des lames segmentaires et de la ligne primitive. Lorsque le traitement est prolongé, les œdèmes évoluent, d'une part en donnant des vésicules bien délimitées au niveau de l'extrémité caudale de l'embryon et, d'autre part, en s'étendant latéralement d'une façon plus diffuse.

Ces effets s'atténuent et deviennent de plus en plus localisés à mesure que l'on traite des embryons de plus en plus âgés. Chez les embryons de plus de 48 heures d'incubation, seule la région postérieure de l'embryon réagit nettement.

Le mécanisme par lequel cet état œdémateux est produit n'est pas connu. On peut cependant envisager plusieurs hypothèses. Le bleu trypan pourrait créer un équilibre de Donnan altérant la répartition des électrolytes diffusibles de part et d'autre de la membrane cellulaire. Cette altération se traduirait par un changement de la pression osmotique du fluide interstitiel de l'embryon et de celle du liquide sous-germinal. Un tel effet a été invoqué par COURRIER (1923) pour expliquer l'action du rouge Congo sur l'œuf d'Oursin. Un changement dans la répartition des électrolytes diffusibles pourrait aussi bien résulter du fait que le colorant se fixe sur les protéines et précipite avec les cathions bivalents. Remarquons que cet effet s'oppose à l'effet Donnan. Puisque l'action du colorant est plus ou moins localisée, l'hypothèse d'un trouble dans les échanges d'électrolytes en exige une autre, à savoir que la perméabilité du blastoderme varie d'une région à l'autre et, dans une même région, au cours du développement. En fait, l'étude de la pénétration du bleu

trypan montre que la supposition est justifiée.

Il est donc possible, sinon probable, que le colorant entraîne un déséquilibre osmotique entre le blastoderme et les fluides qui l'entourent. Mais il ne s'agit pas là d'un facteur essentiel. En effet, diverses observations prouvent que dans ce phénomène l'embryon n'est pas passif.

D'abord, lorsque l'embryon est traité peu de temps puis reporté en milieu normal, l'œdème apparaît quand même dans certains cas. Il n'apparaît pas dans d'autres cas, sans doute parce que les embryons n'ont pas absorbé assez de colorant.

De plus, l'aspect lacuneux de l'ectoderme se manifeste avant la formation des vésicules, même si le colorant est injecté sous l'endoderme ou déposé contre lui. Il en va de même pour les dépôts de phosphate de calcium qui augmentent très tôt dans les cellules ectodermiques. Dans cette expérience, endoderme et mésoderme sont nécessairement touchés avant l'ectoderme; ils devraient réagir d'abord si l'embryon était passif. Enfin, le fait que les œdèmes se développent dans les régions où le colorant est absorbé montre que c'est bien l'absorption du colorant qui est en cause et non une modification du milieu.

Pourtant, il n'est guère concevable que le colorant absorbé provoque par sa seule présence un déséquilibre osmotique.

En effet, le calcium est peu abondant et son importance dans l'équilibre osmotique de l'embryon est sans doute faible. D'autre part, la plus grande partie du colorant est probablement dans l'embryon sous forme combinée (en particulier au calcium) et insoluble, donc sans effet osmotique. De plus, il y a davantage de colorant à l'extérieur de l'embryon, de sorte que s'il devait y avoir un déséqui-

libre osmotique du fait de la présence du bleu trypan sous forme ionisée (qui aurait un effet osmotique), c'est le milieu extérieur qui serait hypertonique. Dans cette hypothèse, l'embryon devrait perdre de l'eau; or c'est l'inverse qui se produit. Enfin, les œdèmes ne se développent que lorsque les embryons sont incubés.

La formation des œdèmes dépend donc de l'activité physiologique de l'embryon et non d'un simple effet physique.

Le bleu trypan est efficace quel que soit le côté de l'embryon sur lequel on l'applique (ANCEL [1942], STÉPHAN et SUTTER [1960] ont déposé le colorant du côté de l'ectoderme). On peut en conclure que la polarité des transports d'eau (NEW, 1956) n'est pas en cause. Il apparaît donc peu probable que l'ectoderme et l'endoderme jouent un rôle déterminant dans la formation de l'œdème. Cette formation requiert la participation des trois feuillets dans les régions qui réagissent à l'application de colorant.

Cependant, il est possible que les cellules mésodermiques soient, en dernière analyse, à l'origine de ce phénomène, bien qu'elles ne jouent pas de rôle direct dans l'absorption d'eau. En effet, les cellules du mésoderme réagissent particulièrement vite au traitement. Dans les lames segmentaires, les cellules s'éloignent des points de pénétration du colorant avant que les vésicules n'apparaissent. Leur activité succinodéshydrogénasique est augmentée comme celle des cellules ectodermiques et endodermiques. D'autre part, au niveau des vésicules, la structure de l'ectoderme diffère selon qu'elles contiennent ou non des cellules mésodermiques. Dans le premier cas, l'épithélium ectodermique est haut et lacuneux; dans le second cas, il est mince et d'apparence continue (une réaction analogue a été décrite par WADDINGTON

et coll. [1955-1958] après action de la p-fluoro-phényle-analine et de la 8-azaguanine; ces produits nécrosent le mésenchyme présomitique et il en résulte la formation de vésicules). Mais cet aspect de l'ectoderme ne dépend peut-être que de la tension à laquelle il est soumis, la présence (ou l'absence) de cellules mésodermiques pouvant être conditionnée par le même facteur. Enfin, on constate que l'effet du bleu trypan devient de plus en plus localisé à mesure que la structure du mésoderme change. Dans l'aire extra-embryonnaire, l'œdème apparaît bien si les feuillets coelomiques ne sont pas encore bien différenciés. Dans l'embryon, il s'établit surtout dans les lames segmentaires et bien plus difficilement au même niveau lorsqu'elles se sont différenciées en somites.

b) *Inhibitions de la morphogénèse :*

Parmi ces inhibitions, il faut distinguer les arrêts de différenciation affectant des structures, qui cependant sont reconnaissables, d'avec l'absence de différenciation qui résulte d'une déficience du matériel présomptif.

A la première catégorie appartiennent les inhibitions des mouvements morphogénétiques : gastrulation, neurulation, fermeture du tube intestinal. Elles ne sont pas spécifiques du produit. Elles traduisent surtout la grande sensibilité des embryons aux stades où elles se produisent. Mais elles sont sûrement favorisées par l'état œdémateux des embryons. L'arrêt de l'élongation de la corde, qui peut être provoqué aussi par la ribonucléase (LANOT et STÉPHAN, 1966), résulte probablement de la fragilité des cellules cordales aux stades précoces. Dans ce dernier cas, l'état de différenciation des cellules conditionne le phénomène, car les effets diminuent avec le stade bien

que le bleu trypan pénètre toujours dans le bulbe cordal. Les cellules qui le constituent deviennent donc moins sensibles. La formation des blocs de somites appartient aussi à ce type d'inhibition. Cependant, cet effet apparaît beaucoup plus spécifique. Il ne s'agit pas, dans ce cas, d'un arrêt de la différenciation cellulaire, mais d'un retard dans la formation de l'épithélium somitique. Peut-être l'effet complexant du colorant à l'égard des ions calcium est-il responsable de cette action ?

De cette catégorie dépendent enfin les déficiences qui se manifestent, à longue échéance ou dans les cas d'atteintes graves, à la partie postérieure du tube neural et de la corde, et d'autres moins apparentes qui se produisent dans l'ébauche néphritique et même les lames latérales.

Les inhibitions de la seconde catégorie, celles qui se traduisent par la suppression de matériel présomptif, se présentent au niveau des lames segmentaires, de la ligne primitive et du bourgeon caudal.

Toutes ces déficiences ont plusieurs causes. Aux stades précoces, le colorant provoque des nécroses qui réduisent la quantité de matériel cellulaire.

Au-delà de la trentième heure d'incubation, le traitement ne se traduit plus par des dégénérescences massives. Bien que les comptages ne montrent pas de différences significatives entre les embryons traités et les témoins — la méthode est inefficace parce que la variabilité des embryons, en ce qui concerne l'index mitotique, est très grande —, il est probable que la croissance cellulaire est freinée. Le colorant agit d'ailleurs sur la synthèse des ADN. Les déficiences du tube neural, simples réductions de taille, ne peuvent s'expliquer que de cette façon.

Enfin, dans le mésoderme des lames segmentaires et au voisinage de la ligne primitive, les cellules s'écartent de la région œdémateuse. Ce phénomène, qui apparaît lors des comptages et par observation directe des embryons, est sans doute le facteur prédominant dans l'instauration des déficiences du mésoderme présomitique. A cet égard se pose le problème de la destinée des cellules qui migrent. Constatons qu'aux stades précoces ces cellules sont chassées vers l'avant et pourraient dégénérer. En effet, la densité cellulaire s'accroît à l'avant des lames segmentaires, mais la quantité de cellules saines reste la même. Les cellules en excès sont pycnotiques. Après traitement tardif, il ne paraît pas y avoir d'augmentation notable de la densité cellulaire à l'avant des lames segmentaires. Pourtant une migration des cellules a été constatée au cours des premières phases du traitement (LAXOT, 1969 c). Il est probable que l'importance de la multiplication cellulaire dans les lames segmentaires dépend dans une certaine mesure de la densité cellulaire. Il pourrait exister un mécanisme compensateur qui freine la croissance, à partir d'une certaine valeur de la densité cellulaire. Cette hypothèse ne peut pas être vérifiée par la méthode des comptages.

Quant aux hémorragies, plusieurs facteurs peuvent concourir à les déclencher. En premier lieu la rupture des vaisseaux peut être due à une atteinte des cellules endothéliales. En second lieu, il est possible que le mésenchyme qui entoure certains vaisseaux leur donne une résistance supplémentaire. La nécrose ou la dispersion de ce mésenchyme pourrait se traduire par une fragilité plus grande des parois endothéliales. Enfin, la localisation des hémorragies semble indiquer que la perméabilité du blastoderme pour

le colorant conditionne le phénomène.

Il est peu vraisemblable que les vaisseaux aient normalement une résistance mécanique moindre aux endroits où se produisent les hémorragies : aux stades considérés les vaisseaux ont partout la même structure. De plus, la fragilité des parois vasculaires ne tient probablement pas à un manque de cellules. Ceci peut être montré en comparant l'action de toxiques très généraux, qui s'exerce justement dans la région des lames segmentaires, à celle du bleu trypan. Ainsi, le chlorure de lithium (NICOLET, 1965), des analogues d'acides aminés (WADDINGTON et coll., 1955, 1958), des analogues de purines (WADDINGTON et coll., 1958 ; FRAIR et WOODSIDE, 1956), le 2-éthyl-5-méthyl-benzimidazole et le chloramphénicol (BLACKWOOD, 1962), des moutardes à l'azote, la triéthylmélamine (JURAND, 1958, 1960, 1963), l'actinomycine D (PIERRO, 1961 *a* et *b*; KLEIN et PIERRO, 1963; HEILPORN-POHL, 1964) et la ribonucléase (LANOT et STÉPHAN, 1966) produisent des déficiences des lames segmentaires, sans provoquer régulièrement d'hémorragies au niveau postérieur des aortes. Aux stades étudiés, ni les atteintes du mésenchyme voisin des aortes, ni celles des cellules endothéliales ne déclenchent les hémorragies.

On peut penser que l'action de ces toxiques est favorisée par une pénétra-

tion accrue au niveau de la région caudale de l'embryon. Par contre, l'action du bleu trypan sur les aortes apparaît plus spécifique; parmi tous les produits essayés par ANCEL, seuls les sels de quinine et de strychnine ont provoqué des hémorragies caudales dans des proportions comparables. Il s'agit sans doute d'une atteinte directe de l'endothélium. Peut-être l'effet chélateur du colorant en est-il responsable.

En définitive, la sensibilité de l'embryon au colorant est conditionnée par l'état de différenciation des cellules : les embryons jeunes sont plus sensibles que les vieux. D'autre part, l'embryon ne réagit que là où le colorant pénètre dans le liquide interstitiel. L'action tératogène n'est donc pas indépendante de l'activité physiologique de l'embryon.

Il est curieux de constater que la perméabilité de l'endoderme et de l'ectoderme varie dans le même sens que la sensibilité du mésoderme : le colorant ne pénètre bien que là où le mésoderme reste à l'état de mésenchyme. Les deux évolutions ne sont donc pas indépendantes, mais les liens de causalité ne sont pas connus.

Ainsi, sur le plan physiologique, l'effet tératogène du bleu trypan résulte du fait que la perméabilité au colorant est la plus forte dans les régions où le mésoderme est le plus sensible.

RÉSUMÉ

L'application du bleu trypan détermine quatre sortes de réactions morphologiques, variables suivant les stades :

- l'apparition d'œdèmes qui peuvent devenir hémorragiques;
- une inhibition des mouvements morphogénétiques;

une réduction de taille des ébauches touchées par l'action du colorant.

la formation de blocs de somites.

1° Si l'on compare des embryons traités à différents stades, il apparaît que l'action du colorant est générale chez l'embryon de 24 heures d'incubation. Par la suite, les effets

du colorant se limitent progressivement à la région postérieure de l'embryon.

2° Le bleu trypan ne provoque pas d'anomalies mitotiques. Des pycnoses apparaissent lorsque le colorant est appliqué avant la trentième heure d'incubation. Elles sont caractérisées par une dilatation du nucléole et une séparation des deux types de nucléoprotéines.

3° Les effets éventuels du colorant sur la croissance cellulaire ont été étudiés dans les lames segmentaires et les derniers somites chez de jeunes embryons (environ 4 paires de somites), traités pendant 5 h 30 à 6 heures. L'application de colorant ne modifie pas l'index mitotique quel que soit le niveau considéré.

Chez les embryons traités au stade 10 paires de somites, fixés à différents intervalles de temps, l'index mitotique n'est pas significativement modifié.

L'étude cytophotométrique des quantités

d'ADN montre cependant que la synthèse des ADN peut être inhibée.

4° Le bleu trypan agit directement sur le mésenchyme présomitique en ralentissant la formation de l'épithélium somitique.

5° L'activité de la déshydrogénase succinique a été étudiée chez les embryons normaux à divers stades et chez les embryons traités au bleu trypan.

Le colorant augmente l'activité de l'enzyme dans les régions qui sont les plus sensibles à son action tératogène.

6° Le colorant ne provoque pas de modification de l'activité de la phosphatase acide qui soit détectable par les méthodes histo-chimiques.

7° Il détermine une augmentation des dépôts de phosphate de calcium dans les cellules de l'ectoderme et de l'endoderme. Ces dépôts résultent vraisemblablement d'une activité ATP-ase des cellules.

SUMMARY

A contribution to the study of the teratogenic potency of trypan blue in chick embryo.

The treatment by trypan blue causes four kinds of morphological reactions that vary according to the stage :—

— appearance of oedema which may become hemorrhagic;

— reduction in size of the primordia affected by the dye's action;

— formation of somite blocs.

1° If one compares embryos treated at different stages, it appears that the dye's action is general in the 24 hours embryo. Later on, the effects of the dye become progressively limited to the posterior region of the embryo.

2° Trypan blue does not induce mitotic anomalies. Pycnosis appear when the dye is given before the 30th hour of incubation. They are characterised by a swelling of the nucleolus and the partition of the two types of nucleoproteins.

3° The possible effects of the dye upon cell growth have been studied within the segmentary plates and the last pair of somites of

young embryos (about 4 pairs of somites) treated during 5 h 30 to 6 h. At any level the application of the dye does not change the mitotic index.

In embryos treated at stage 10 (10 pairs of somites) and fixed after different periods the mitotic index is not significantly modified.

The cytophotometric study of DNA amounts shows however that the DNA synthesis may be inhibited.

4° Trypan blue acts directly upon presomitic mesenchyme by slowing down the formation of the somitic epithelium.

5° The activity of succinic deshydrogenase has been studied in normal embryos at different stages and in embryos treated with trypan blue.

The dye increases the enzyme activity in the regions that are the most sensitive to its teratogenic action.

6° The dye does not induce any modification of acid phosphatase activity which can be detected by histochemical methods.

7° It causes an increase of calcium phosphate deposits in the cells of ectoderm and endoderm. It is likely that these deposits result from an ATP-ase activity in the cells.

BIBLIOGRAPHIE

- ANCEL (P.), 1950. — La chimiotératogénèse. Réalisation des monstruosités par des substances chimiques chez les Vertébrés. *G. Doin et C^o*, édit., Paris.
- ANCEL (P.) et LALLEMAND (S.), 1942 *a*. — Sur l'arrêt du développement du bourgeon caudal obtenu expérimentalement chez l'embryon de Poulet. *Arch. Phys. Biol.*, **15**, suppl. n° 43.
- 1942 *b*. — Sur le pouvoir tératogène des hémorragies déterminées par des substances chimiques chez l'embryon de Poulet. *Arch. Phys. Biol.*, **16**, suppl. n° 59.
- BATTLE (H. I.) et LALE (H. W.), 1960. — Trypan blue-induced anomalies in embryos of the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Anat. Rec.*, **138**, 333.
- BEAUDOIN (A.), et WILSON (J. G.), 1958. — Teratogenic effect of trypan blue on the developing chick. *Proc. Soc. exper. Biol. Med. U.S.A.*, **97**, 85-90.
- BECK (F.), 1965. — The distribution of acid phosphatase in the chick blastoderm. *Exp. Cell. Res.*, **37**, 504-508.
- BECK (F.) et LLOYD (J. B.), 1966. — The teratogenic effects of azo dyes. In *Advances in teratology*, **1**, 131-193. D. H. M. Woollam, *Logos Press, Academic Press*, London and New-York.
- BLACKWOOD (U. B.), 1962. — The changing inhibition of early differentiation and general development in the chick embryo by 2-ethyl-5-méthyl-benzimidazole and chloramphenicol. *J. Embryol. exp. Morph.*, **10**, 315-336.
- COURRIER (R.), 1923. — Action d'un colloïde électrolytique : le rouge Congo, sur l'œuf d'Oursin (*Paracentrotus lividus*). *C. R. Soc. Biol.*, **88**, 196-197.
- FRAIR (W. F.) et WOODSIDE (G. L.), 1956. — Effects of 8-azaguanine on early chick embryos grown *in vitro*. *Growth*, **20**, 9-18.
- GALLERA (J.) et NICOLET (G.), 1961. — Quelques commentaires sur les méthodes de culture *in vitro* de jeunes blastoderms de Poule. *Experientia*, **17**, 134-137.
- GILLMAN (J.), GILBERT (C.), GILLMAN (T.) et SPENCE (I.), 1948. — A preliminary report on hydrocephalus, spina bifida and other congenital anomalies in the rat produced by trypan blue. *S. Afr. J. med. Sci.*, **13**, 47-90.
- GRÄPER (L.), 1911. — Beobachtung von Wachstumsvorgängen an Reihenaufnahmen lebender Hühnerembryonen nebst Bemerkungen über vitale Färbung. *Arch. f. Entw. Mech. Org.*, **33**, 303-327.
- GREENHOUSE (G.) et HAMBURGH (M.), 1968. — Analysis of trypan blue induced teratogenesis in *Rana pipiens* embryos. *Teratology*, **1**, 61-74.
- HAMBURGER (V.) et HAMILTON (H. L.), 1951. — A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, **88**, 49-92.
- HEILPORN-POHL (V.), 1964. — Effets de l'actinomycine D sur la morphogénèse et le métabolisme des acides nucléiques chez l'embryon de Poulet. *J. Embryol. exp. Morph.*, **12**, 439-446.
- INGALLS (T. H.), 1957. — Congenital deformities. *Scient. Am.*, **197**, 109-116.
- IVERSEN (S.), 1960. — Visual observations on the localisation of DNA and nucleoli in somatic cell nuclei. *Acta Anat.*, **41**, 160-172.
- JURAND (A.), 1958. — Action of triethanome-lamine (TEM) on early stages of chicks embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*, **6**, 357-362.
- 1960. — Comparative investigations of the action of two nitrogen mustard derivatives on the early stages of development of chick embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*, **8**, 60-67.
- 1963. — Anti-mesodermal activity of a nitrogen mustard derivative. *J. Embryol. exp. Morph.*, **11**, 689-696.
- KAPLAN (S.) et GRABOWSKI (C.), 1967. — Analysis of trypan blue-induced rumplessness in chick embryos. *J. exp. Zool.*, **165**, 325-336.
- KAPLAN (S.) et JOHNSON (M.), 1968. — Oxygen consumption in normal and trypan blue treated chick embryos. *Teratology*, **1**, 369-373.
- KARNOFSKY (D. A.) et LACON (C. R.), 1961. — Effects of physiological purines on the development of the chick embryo. *Biochem. Pharmacol.*, G. B., **7**, 154-158.
- KLEIN (N. W.) et PIERRO (L. J.), 1963. — Actinomycin D : specific inhibitory effects on the explanted chick embryo. *Science*, **142**, 967.
- LANOT (R.), 1962. — Premières réactions au bleu trypan de l'embryon de Poulet en cours de gastrulation. *C. R. Soc. Biol.*, **156**, 918-920.
- 1963. — Action du bleu trypan sur les cellules du jeune embryon de Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, **157**, 1049-1051.
- 1967. — Analyse expérimentale de la formation des somites mésodermiques chez l'embryon de Poulet. *C. R. Assoc. Anat.*, **138**, 740-749.
- 1969 *a*. — La formation des somites chez

- l'embryon de Poulet. *Bull. Acad. et Soc. Lorraine des Sciences*, **8**, 115-120.
- 1969 b. — Activités ATP-asiques chez le jeune embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **268**, 360-363.
- 1969 c. — Fixation et absorption du bleu trypan par le jeune embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **269**, 2567-2569.
- LANOT et STEPHAN (F.), 1966. — Réaction de l'embryon de Poulet à la tibonucléase alcaline. *C. R. Assoc. Anat.*, **152**, 596-609.
- MARIT (C.) et MILAIRE (J.), 1961. — Une technique modifiée pour la détection des phosphomono-estérases acide et alcaline et de l'adénosine-triphosphatase dans les tissus embryonnaires. *Histochemie*, **2**, 298-305.
- MOOG (F.), 1944. — Localisations for alkaline and acid phosphatases in the early embryogenesis of the chick. *Biol. Bull.*, **86**, 51-80.
- MULHERKAR (L.), 1960. — The effects of trypan blue on chick embryos cultured *in vitro*. *J. Embryol. exp. Morph.*, **8**, 1-5.
- NEW (D. A. T.), 1956. — The formation of sub-blastodermic fluid in Hen's eggs. *J. Embryol. exp. Morph.*, **4**, 221-227.
- NICOLET (G.), 1965. — Action du chlorure de lithium sur la morphogénèse du jeune embryon de Poule. *Acta Embryol. Morph. exp.*, **8**, 32-85.
- PIERRO (L. J.), 1961 a. — Teratogenic action of actinomycine D in the embryonic chick. *J. exp. Zool.*, **147**, 203-210.
- 1961 b. — Teratogenic action of actinomycine D in the embryonic chick. II. Early development. *J. exp. Zool.*, **148**, 241-245.
- SPRATT (N. T. Jr.), 1958. — Analysis of the organizer center in the early chick embryo. IV. Some differential enzyme activities of node center cells. *J. exp. Zool.*, **138**, 51-79.
- STÉPHAN (F.) et SUTTER (B.), 1960. — Action du bleu trypan sur la différenciation du mésoderme axial chez l'embryon de Poulet. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **154**, 1620-1622.
- 1961. — Réactions de l'embryon de Poulet au bleu trypan. *J. Embryol. exp. Morph.*, **9**, 410-421.
- TURCHINI (J.), 1967. — Recherches récentes sur l'induction enzymatique. In : « De l'embryologie expérimentale à la biologie moléculaire ». Dunod, édit., Paris.
- WADDINGTON (C. H.), FELDMAN (M.) et PERRY (M.), 1955. — Some specific developmental effects of purine antagonists. *Exp. Cell Res.*, suppl. n° 3, 366-380.
- WADDINGTON (C. H.) et PERRY (M.), 1956. — Teratogenic effects of trypan blue on amphibian embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*, **4**, 110-119.
- 1958. — Effects of some amino-acid and purine antagonists on chick embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*, **6**, 365-372.
- WOLFF (Et.), 1936. — Les bases de la tératogénèse expérimentale des Vertébrés amniotes, d'après les résultats de méthodes directes. *Arch. Anat. Hist. Embryol.*, **22**, 1-382.
- ZARETZKY (S.), 1910. — Versuche über vitale Färbung des Embryos. *Virshovs Arch. J. Path. u. Physiol.*, **201**, 25-45.

**ARCHIVES
D'ANATOMIE MICROSCOPIQUE
ET DE
MORPHOLOGIE EXPÉRIMENTALE**

COMITÉ DE RÉDACTION :

M. AVEL (BORDEAUX), J. BENOIT (PARIS),
R. COURRIER (PARIS),
R. COUTEAUX (PARIS),
E. FAURÉ-FREMIET (PARIS),
A. LACASSAGNE (PARIS),
J. TURCHINI (MONTPELLIER),
ET. WOLFF (PARIS).

SECRÉTAIRE DE RÉDACTION :

A. JOST (PARIS).

CONDITIONS DE PUBLICATION

Les **Archives d'Anatomie microscopique**
paraissent quatre fois par an, par fascicule de
80 à 96 pages avec de nombreuses figures et
planches hors texte.

ABONNEMENT ANNUEL (1971)

France et Zone franc F 130

ÉTRANGER :

Belgique Fr. B. 1.633

Italie..... Lires 20.250

Autres pays..... F 180

également payables dans les autres monnaies, au cours
des règlements commerciaux du jour du paiement

Les règlements venant de l'étranger peuvent être faits par
l'une des voies suivantes :

- a) Chèque sur Paris d'une banque officielle.
- b) Virement par banque sur compte étranger.
- c) Mandat international.

MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS, 120, Bd St-Germain, PARIS (6^e)

PRINTED IN FRANCE